



**Ana Rosário Pinho
Sousa Tavares**

**Resistência antimicrobiana em exsudatos e
detecção de β -lactamases em *Proteus***



**Ana Rosário Pinho
Sousa Tavares**

**Resistência antimicrobiana em exsudatos e
detecção de β -lactamases em *Proteus***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em microbiologia, realizada sob a orientação científica do Doutor António Correia, Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação da Dr^a Fátima Madail, Chefe e Directora do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Visconde de Salreu

Dedico este trabalho à minha mãe e ao Mauro, pela motivação e apoio que sempre me deram.

o júri

presidente

Profª Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Anabela de Oliveira Pereira
Investigadora em Pós-graduação do CESAM na Universidade de Aveiro

António Carlos Matias Correia
Prof. Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Drª Maria de Fátima Jesus Madail
Licenciado em Medicina. Directora de Serviço de Patologia Clínica do Hospital
Visconde de Salreu

agradecimentos

Ao Professor Doutor António Correia, orientador, pela disponibilidade e dedicação que sempre demonstrou.

À Dr^a Fátima Madail, co-orientadora, pela generosidade com que sempre partilhou os seus conhecimentos, pela atenção que nunca me negou, pela amizade e carinho.

Ao Hospital Visconde de Salreu pela oportunidade de realizar o estágio, a disponibilidade de recursos e a confiança.

Às colegas do Laboratório do Hospital Visconde de Salreu, Lúcia Botte, Sara Lopes, Dr^a Luísa Amaral, pela sua incansável ajuda, simpatia e companheirismo.

À Professora Doutora Isabel Henriques da UA pela disponibilidade no armazenamento das amostras e pelo apoio e orientação na realização da parte prática do meu trabalho na UA.

À Dr^a Juliana Azevedo, pelo apoio e orientação na parte prática do meu trabalho na UA.

À minha família e ao meu namorado, especialmente à minha mãe, pelo seu companheirismo e incentivo na concretização deste trabalho.

À SEMA, local onde eu trabalho, especialmente ao Sr. Teixeira Valente e Eng^a. Sofia, que facilitaram o meu horário de trabalho e manifestaram sempre palavras de incentivo.

Aos meus colegas de curso, pela força e sugestões.

palavras-chave

Resistência antimicrobiana, antibióticos, feridas operatórias, úlceras de pressão, β -lactamases, *Proteus mirabilis*

resumo

Os antibióticos são um dos grupos de medicamentos mais utilizados na medicina humana, medicina veterinária, agricultura e aquicultura. O seu uso em larga escala contribui para a selecção e disseminação de microrganismos resistentes aos antibióticos, tanto a nível nosocomial como na comunidade (embora em menor expressão).

O presente trabalho propôs-se a estudar o perfil de resistência das bactérias isoladas nos anos de 2008 e 2009 em feridas operatórias e úlceras de pressão, no Hospital Visconde de Salreu (HVS) e a compara-lo com um estudo realizado entre 1998 e 2002. E ainda estudar a resistência às β -lactamases no género *Proteus spp.*

Verificou-se que os microrganismos mais frequentemente isolados foram os *Staphylococcus aureus*, com maior incidência nos *Staphylococcus aureus metilino* resistentes (MRSA).

Nas úlceras de pressão verificou-se também uma grande incidência de *Pseudomonas aeruginosa*.

Os *S. aureus* manifestaram elevada sensibilidade à vancomicina e teicoplanina e bastante resistência à penicilina, a *P. aeruginosa* apresentou elevada resistência ao cotrimoxazol, à amoxicilina e à amoxicilina + ác. clavulânico e elevada sensibilidade ao imipeneme e à ceftazidima.

Na resistência às β -lactamases no género *Proteus spp* verificou-se que esta bactéria não possuía os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}.

keywords

Antimicrobial resistance, antibiotics, surgical wounds, pressure ulcers, β -lactamases, *Proteus mirabilis*

abstract

Antibiotics are one of the group of drugs most used in human medicine, veterinary medicine, agriculture and aquaculture.

Its widespread use contributes to the selection and spread of antibiotic-resistant microorganisms, both in nosocomial and community level (although at lower expression).

This work aimed to study the resistance of isolated bacteria during the years 2008 and 2009, of surgical wounds and pressure ulcers in Hospital Visconde Salreu (HVS) and compares it to a study conducted between 1998 and 2002. And still studying resistance to β -lactamases in the genus *Proteus spp.*

It was found that the most frequently isolated microorganisms were *Staphylococcus aureus*, with higher incidence in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

In pressure ulcers there was also a high incidence of *Pseudomonas aeruginosa*.

The *S. aureus* showed high sensibility to vancomycin and teicoplanin and enough resistance to penicillin. The *P. aeruginosa* was highly resistant to cotrimoxazole, amoxicillin and amoxicillin/clavulanate and highly sensitive to imipenem and ceftazidime.

In resistance to β -lactamases in the genus *Proteus spp* was found that this bacterium did not possess the genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}.

Índice

Índice.....	i
Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tabelas.....	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
1 Introdução.....	1
1.1 Célula Bacteriana.....	2
1.1.1 Parede Celular.....	2
1.1.2 Coloração de Gram.....	4
1.1.3 Membrana citoplasmática ou membrana celular.....	5
1.1.4 Cápsula	5
1.1.5 Flagelos, pili e fímbrias.....	6
1.1.6 Esporos.....	6
1.2 Antibióticos.....	6
1.2.1 Resistência Adquirida.....	8
1.2.1.1 Plasmídeos.....	8
1.2.1.2 Integrões.....	9
1.2.1.3 Transposições.....	9
1.2.1.4 Interação entre elementos móveis.....	10
1.2.2 β -lactâmicos: características, modo de acção e mecanismos de resistência.....	11
1.2.2.1 A resistência por acção de β - Lactamases.....	13
1.2.2.2 Classificação das β - Lactamases.....	15
1.2.3 Aminoglicosídeos.....	17
1.2.4 Quinolonas.....	18
1.2.5 Sulfonamidas e Trimetoprim.....	20
1.3 A espécie bacteriana <i>Proteus mirabilis</i>	22
1.4 Genotipagem – por métodos envolvendo amplificação por PC.....	23
1.5 Os RNAs ribossomais.....	25
2 Contexto e objectivos do presente trabalho.....	26
3 Material e Métodos.....	27
3.1 Resistência antimicrobiana em exsudatos.....	27
3.1.1 Caracterização da Unidade Hospitalar e do serviço.....	27
3.1.2 Período e desenho.....	27

3.1.3 Procedimentos laboratoriais.....	28
3.1.4 Identificação dos isolados bacterianos e provas de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	28
3.1.5 Detecção da resistência à metilina das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
3.2 Detecção e Pesquisa de β -lactamases.....	30
3.2.1 Extração de DNA genómico a partir de células de culturas bacterianas.....	30
3.2.2 Electroforese em gel de agarose - para visualização de DNA.....	32
3.2.3 Amplificação do gene 16S rDNA para identificação da estirpe.....	33
3.2.4 Detecção de genes de β -lactamases por PCR.....	34
3.2.5 Limpeza de reacções de PCR para sequenciação.....	36
4 Resultados.....	37
4.1 Resistência antimicrobiana em exsudatos	37
4.1.1 Amostras.....	37
4.1.2 Microrganismos Isolados.....	38
4.1.3 Perfil de resistência aos antimicrobianos.....	40
4.1.4 Bactérias multi-resistentes isoladas de Janeiro a Março de 2010.....	44
4.2 Detecção e Pesquisa de β -lactamase.....	47
4.2.1 Electroforese em gel de agarose - DNA <i>Proteus spp</i>	47
4.2.2 Electroforese em gel de agarose - 16S rDNA.....	48
4.2.3 Sequenciação	48
4.2.4 Electroforese em gel de agarose - genes β -lactamases TEM, SHV e CTX-M.....	48
5 Discussão.....	50
6 Conclusão.....	56
7 Perspectivas futuras.....	58
8 Bibliografia.....	59
9 Anexo.....	63

Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da estrutura primária do peptidoglicano NAM – ácido N-acetilmurâmico; NAG - N-acetilglucosamina (adaptado de Van H J 2001).....	2
Figura 2: Representação esquemática do envelope celular das bactérias Gram positivas e Gram negativas (Silhavy TJ <i>et al</i> 2010).....	4
Figura 3: Etapas da coloração de Gram (http://faculty.irsc.edu).....	5
Figura 4: Esquema dos locais de actuação e mecanismo de resistência dos diferentes grupos de antibióticos (http://www.biomedcentral.com).....	7
Figura 5: Plasmídeo com sequências que conferem resistência à ampicilina e tetraciclina, uma origem de replicação (ori) e sítios de restrição (EcoRI, Sall e PstI) (http://users.med.up.pt).....	8
Figura 6: Estrutura Básica de um integrão. <i>IntI</i> (codifica a enzima integrase), <i>attI</i> (local de recombinação) e PC P2 (Potenciais promotores, devidamente orientados para a expressão de cassetes inseridas) (Di Conza JA 2010).....	9
Figura 7: Interacção entre os diferentes elementos genéticos móveis (Norman A <i>et al</i> 2009).....	10
Figura 8: Estrutura química dos principais grupos dos β -lactâmicos (Sousa J 2006).....	11
Figura 9: Penetração da PC das bactérias Gram positivas e Gram negativas por β -lactâmicos (Sousa J 2006).....	12
Figura 10: Anel β -lactâmico (Morello JA <i>et al</i> 2002).....	14
Figura 11: Classificação dos aminoglicosídeos baseados na estrutura química (Sousa J 2006).....	17
Figura 12: Estrutura química do ácido nalidíxico e de seis fluoroquinolonas (adaptado de Wolfson JS <i>and</i> Hooper DC 1984).....	18
Figura 13: Estrutura geral das sulfonamidas (Sousa J 2006).....	20
Figura 14: Esquema da via de síntese do ácido fólico e locais de acção dos antibióticos sulfonamidas e trimetoprim (Sousa J 2006).....	21
Figura 15: Factores de virulência do género <i>Proteus spp</i> (Rózalski A <i>et al</i> 1997).....	22
Figura 16: Principais características fenotípicas de 4 espécies de <i>Proteus</i> (Elmer W. Koneman).....	23
Figura 17: Número de microrganismos multi-resistentes isolados de exsudatos no período de Janeiro a Março de 2010.....	44
Figura 18: Electroforese de DNA genómico das células de <i>Proteus spp</i> . M: Marcador GeneRuler™ 1 k Plus DNA Ladder (Fermentas); 1: DNA <i>Proteus spp</i>	47
Figura 19: Electroforese dos produtos resultantes da amplificação do gene 16S rDNA de <i>Proteus spp</i> . M: Marcador: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) 1: gene 16S rDNA.....	48

Figura 20: Electroforese dos produtos resultantes da amplificação dos genes de β -lactamases. M: Marcador: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas); 1: gene <i>bla</i> _{TEM} ; 2: TEM+; 3: TEM-; 4: gene <i>bla</i> _{SHV} ; 5: SHV+; 6: SHV- 7: gene <i>bla</i> _{CTX-M} ; 8: CTX+; 9: CTX-.....	49
Figura 21: Microrganismos mais isolados do estudo realizado no HVS, entre 1998 e 2002.....	63
Figura 22: Perfil de sensibilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> aos antimicrobianos, estudo realizado no HVS, entre 1998 e 2002.....	64
Figura 23: Perfil de sensibilidade de <i>Pseudomona aeruginosa</i> aos antimicrobianos, estudo realizado no HVS, entre 1998 e 2002.....	64
Figura 24: Perfil de sensibilidade de <i>Proteus mirabilis</i> aos antimicrobianos, estudo realizado no HVS, entre 1998 e 2002.....	65
Figura 25: Perfil de sensibilidade de <i>Escherichia coli</i> aos antimicrobianos, estudo realizado no HVS, entre 1998 e 2002.....	65
Figura 26: Sequência do gene 16S rDNA da bactéria <i>Proteus spp</i>	66

Índice de Tabelas

Tabela 1: Antibióticos β -lactâmicos usados no Hospital Visconde de Salreu (HVS).....	12
Tabela 2: Classificação das β -lactamases de acordo com Bush (Bush K and Jacoby GA 2010).....	15
Tabela 3: Famílias de β -lactamases de maior importância clínica (Bush K and Jacoby GA 2010).....	16
Tabela 4: Marcadores e concentração do gel utilizado nas diferentes electroforeses.....	32
Tabela 5: <i>Primers</i> e respectiva sequência para amplificação do gene 16S rDNA. (Henriques IS <i>et al</i> 2006).....	33
Tabela 6: <i>Primers</i> e respectiva sequência, controlo positivo e tamanho do gene para amplificação do genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{CTX-M} (Henriques IS <i>et al</i> 2006).....	34
Tabela 7: Exsudatos processados em 2008 e 2009 e respectivo exame cultural.....	37
Tabela 8: Dados relativos à proveniência dos exsudatos processados e respectivo exame cultural.....	38
Tabela 9: Microrganismos isolados das amostras de feridas operatórias e de úlceras de pressão.....	39
Tabela 10: Abreviatura dos antibióticos de acordo com <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i>	40
Tabela 11: Perfil de resistência dos MRSA e MSSA nas feridas operatórias e úlceras de pressão.....	41
Tabela 12: Perfil de resistência de <i>P. aeruginosa</i> nas feridas operatórias e úlceras de pressão.....	41
Tabela 13: Perfil de resistência de <i>Proteus mirabilis</i> nas feridas operatórias e úlceras de pressão.....	42
Tabela 14: Perfil de resistência de <i>Escherichia coli</i> nas feridas operatórias e úlceras de pressão.....	43
Tabela 15: Resumo dos dados referentes às amostras colhidas no período de Janeiro a Março de 2010.....	44
Tabela 16: Antibiograma de <i>Staphylococcus spp.</i>	45
Tabela 17: Antibiograma de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
Tabela 18: Antibiograma <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Enterococcus avium</i>	46
Tabela 19: Antibiograma de <i>Proteus mirabilis</i>	46
Tabela 20: Resumo dos microrganismos mais isolados entre 1998 e 2002 e nos anos 2008 e 2009.....	51
Tabela 21: Perfil de resistência de <i>Proteus mirabilis</i> , nas úlceras de pressão nos estudos entre 1998 e 2002 e nos anos 2008 e 2009.....	52
Tabela 22: Perfil de resistência de <i>E.coli</i> , nas úlceras de pressão nos estudos entre 1998 e 2002 e nos anos 2008 e 2009.....	53

Lista de Abreviaturas

DDST - *Double disc synergy test*

E. coli - *Escherichia coli*

ESBL- β -Lactamases de espectro alargado

HVS- Hospital Visconde de Salreu

LPS - Lipopolissacarídeos

MC - Membrana celular

ME - Membrana externa

MSC - Múltiplos Sítios de Clonagem

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina

Ori - Origem de replicação

P. aeruginosa - *Pseudomona aeruginosa*

PBP2' - *Penicillin-binding protein 2'*

PBPs - *Penicillin-Binding-Proteins*

PC - Parede celular

PCR- *Polymerase chain reaction*

RT - Transcrição reversa

RT-PCR - *Reverse transcription-polymerase chain reaction*

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

SI - Sequências de inserção

1 Introdução

O consumo de antimicrobianos é um tema de interesse indiscutível, com aplicação no tratamento das mais diversas infecções, e tem merecido uma atenção particular nos últimos anos devido às crescentes preocupações com a emergência de estirpes microbianas multi-resistentes (Caldeira L *et al* 2006).

O advento dos fármacos antibióticos teve um impacto fundamental no suporte aos avanços da cirurgia moderna, através da possibilidade de reduzir o risco de infecção de feridas operatórias, pela utilização profiláctica com antibióticos. No entanto continua a existir uma taxa de infecção cirúrgica, a nível hospitalar e extra hospitalar, significativa (Caldeira L *et al* 2006), a título de exemplo, na Alemanha este é o terceiro tipo de infecção hospitalar mais comum, depois da pneumonia e das infecções urinárias (Hachenberg T *et al* 2010).

Os factores que favorecem o desenvolvimento deste tipo de feridas são: o estado microbiológico da pele em redor da incisão, a administração precoce ou tardia da profilaxia com antibióticos, diabetes *mellitus*, doenças cancerígenas, tabagismo e idade avançada (Hachenberg T *et al* 2010).

As feridas operatórias para além do seu impacto nas taxas de mortalidade e morbilidade traduzem-se ainda, num aumento dos custos directos e indirectos, resultantes da maior duração do internamento, do consumo acrescido de antibióticos e de outros recursos de diagnóstico e terapêutica (Caldeira L *et al* 2006).

A úlcera de pressão é uma área localizada de morte celular que tende a surgir quando o tecido é comprimido entre uma proeminência óssea e uma superfície dura por um período de tempo. Os locais onde é mais frequente surgirem úlceras de pressão são a região do sacro, região trocantérica e calcâneos. Contudo, qualquer zona do corpo que esteja sujeita a uma pressão prolongada não aliviada é passível de desenvolver úlcera de pressão (cabeça, orelhas, braços, pernas, etc.).

As úlceras de pressão classificam-se em 4 graus, conforme os tecidos que atingem. Quanto mais profunda for, mais elevado é o grau e mais grave é a úlcera de pressão (Gist S *et al* 2009).

Os principais factores de risco para o desenvolvimento de úlcera de pressão são: intensidade e duração da pressão, tolerância dos tecidos para suportarem a pressão, humidade da pele, perda de sensibilidade, diminuição da força muscular, diminuição da mobilidade, incontinência, hipertermia, anemia, desnutrição proteica, tabagismo e idade avançada (Gist S *et al* 2009).

A biosíntese do peptidoglicano passa por três fases: **fase citoplasmática** (síntese do NAM e NAG, os monómeros do peptidoglicano em construção); **fase membranar** (transporte dos monómeros através da MC, alterando-os) e **fase parietal** (colocação dos monómeros na PC da bactéria em crescimento e promoção da ligação entre os monómeros e a PC) (Sousa J 2006).

A PC é responsável pelo diferente comportamento das bactérias em relação à coloração de Gram, o que a faz distinguir em dois tipos de células, de Gram positivas e de Gram negativas (Figura 2) (Sousa J 2006).

A PC das bactérias Gram positivas apresenta-se como uma camada justaposta à MC sendo a célula praticamente sem periplasma e com uma espessa camada de peptidoglicano. Associado ao peptidoglicano encontram-se os ácidos teicóicos e teicurónicos, que não contribuem para a rigidez da PC e uma pequena porção de ácidos teicóicos contendo glicerol associado ao folheto exterior da MC bacteriana – ácidos lipoteicóicos. Estes atravessam a PC e parecem atingir a superfície bacteriana, constituindo antígenos somáticos e os receptores fágicos (Sousa J 2006).

A PC das bactérias Gram negativas é muito mais complexa quanto à sua composição química e quanto à ultraestrutura. É constituída por duas camadas, uma camada rígida onde está o peptidoglicano, com uma espessura de 2-3nm e uma membrana externa (ME).

O espaço entre a MC e a ME denomina-se de periplasma. Esta estrutura apresenta-se como uma matriz de polipeptídeos/sacarídeos, como reservatório de β -lactamases, enzimas degradativas e enzimas de transporte de açúcares e aminoácidos através da MC.

A ME é um organelo característico das bactérias Gram negativas e é constituída por: lipopolissacarídeos (LPS), fosfolípidos, lipoproteínas, proteínas e polissacáridos e funciona como uma barreira na difusão de antibióticos, contendo receptores para bacteriófagos. Encontra-se também envolvida no processo de conjugação e divisão celular e possui vários sistemas de entrada de nutrientes.

O LPS constitui a molécula mais característica das bactérias Gram negativas, localiza-se apenas no folheto externo da ME e é a principal endotoxina bacteriana. É uma molécula anfifílica, com uma região polisacarídica (hidrófila) e o lipídeo A (hidrófoba). O LPS comporta-se como um superantígeno, provocando uma resposta imune exacerbada, que funciona contra o hospedeiro (Silhavy TJ *et al*/2010).

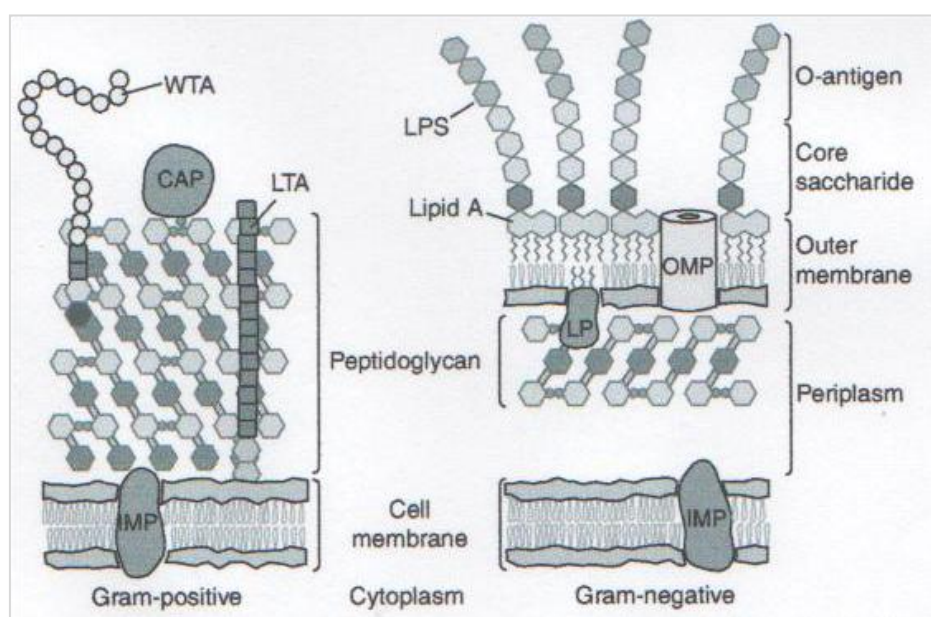


Figura 2: Representação esquemática do envelope celular das bactérias Gram positivas e Gram negativas. (Silhavy TJ *et al* 2010).

1.1.2 Coloração de Gram

A coloração de Gram, desenvolvida, empiricamente em 1884 por Christian Gram, é a coloração diferencial mais utilizada em Microbiologia permitindo classificar as bactérias em dois grupos: as **Gram negativas** e as **Gram positivas**.

De acordo com este procedimento (Figura 3), as células são previamente fixadas, coradas com uma solução de violeta de cristal, lavadas e tratadas com lugol. O iodo forma um complexo com o violeta de cristal, fixando-o à célula. De seguida adiciona-se um agente para descolorar (álcool, acetona ou uma mistura de ambos), no qual o complexo iodo-violeta cristal é solúvel.

Devido à camada fina de peptidoglicano as bactérias Gram negativas não conseguem evitar a passagem do solvente (descorante) e por isso não retêm o complexo iodo-cristal violeta.

As bactérias Gram positivas possuem paredes de peptidoglicano grossas que se desidratam com o álcool, fazendo com que os poros se encerrem, impedindo deste modo que o complexo iodo-cristal violeta saia da célula.

No final, adiciona-se um corante de contraste, normalmente safranina, tornando visíveis os microrganismos Gram negativos que anteriormente tinham sido descorados, através da cor rosa. Enquanto as bactérias Gram positivas aparecem de cor azul violeta (Morello JA *et al* 2002).

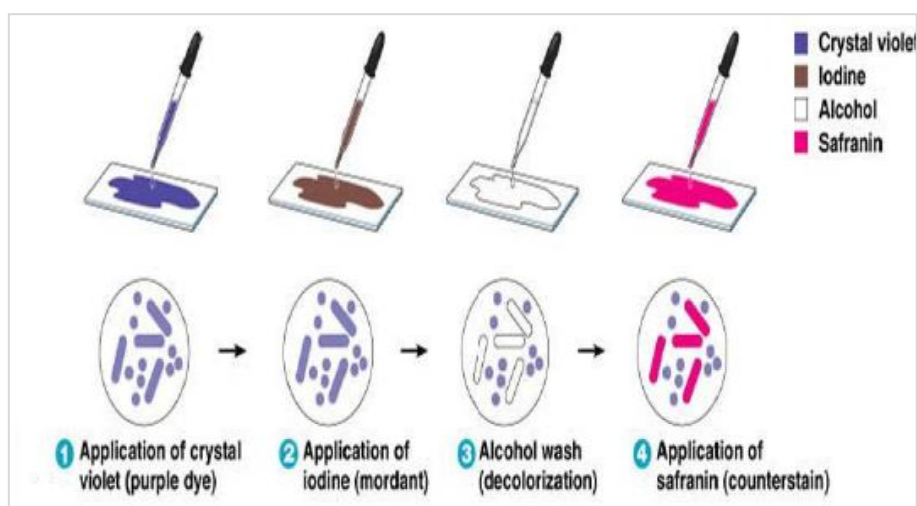


Figura 3: Etapas da coloração de Gram (<http://faculty.irsc.edu>).

1.1.3 Membrana citoplasmática ou membrana celular

A MC, estrutura que rodeia o citoplasma celular, é constituída por uma bicamada fosfolipídica, onde se inserem proteínas integrais e proteínas periféricas. Tem como principal função controlar o fluxo de solutos entre o meio ambiente e o interior da célula (Sousa J 2006).

1.1.4 Cápsula

Entende-se por cápsula um polímero condensado e bem definido que circunda estritamente a célula.

A cápsula contribui para a capacidade de invasão das bactérias, protegendo-as contra a fagocitose, são exemplos de células capsuladas: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* (Brooks GF 2005; Sousa J 2006).

1.1.5 Flagelos, pili e fímbrias

Estas estruturas são apêndices bacterianos proteicos de origem endocelular que se projectam para o exterior celular. Os flagelos são órgãos de locomoção e as fímbrias e pili, mais finos que os flagelos, só são visíveis por microscopia electrónica.

Os pili têm funções sexuais e permitem a transferência de DNA entre células, por conjugação. Muitos genes de resistência aos antibióticos podem ser transferidos por conjugação.

As fímbrias reconhecem receptores celulares nas superfícies epiteliais, permitindo a aderência bacteriana, tornando possível a colonização das mucosas do hospedeiro, havendo a possibilidade de infecção. As fímbrias funcionam como adesinas e desempenham um papel importante na patogénese das infecções (Brooks GF 2005; Sousa J 2006).

1.1.6 Esporos

Certos grupos bacterianos (ex: *Clostridium tetani*) produzem endosporos, formas de resistência aos antibióticos, desinfectantes, antisépticos e ao calor. A entrada dos esporos nas mucosas e através da pele provoca a sua germinação adquirindo a célula bacteriana a sua forma vegetativa e ganhando capacidade infecciosa (Brooks GF 2005; Sousa J 2006).

1.2 Antibióticos

Em 1928, Alexander Fleming descobre que o fungo *Penicillium notatum* produz uma substância com propriedades antibacterianas, designada de **penicilina**. Anos mais tarde, Waksman cria o termo antibiótico, denominando todos os compostos naturais produzidos por microrganismos, que inibem o crescimento microbiano ou têm efeito microbicida.

Presentemente a produção de antibióticos não se faz apenas a partir dos microrganismos, antibióticos naturais, mas também de uma forma sintética.

Os principais grupos de antibióticos usados na terapêutica são agrupados de acordo com o seu alvo na célula bacteriana, podendo ser bactericidas ou bacteriostáticos (Figura 4) (Sousa J 2006).

Existem cinco alvos principais dos antibióticos, são eles: a parede celular das bactérias, síntese proteica, síntese de DNA e RNA e o metabolismo do ácido fólico (vitamina B9) (<http://www.biomedcentral.com>)

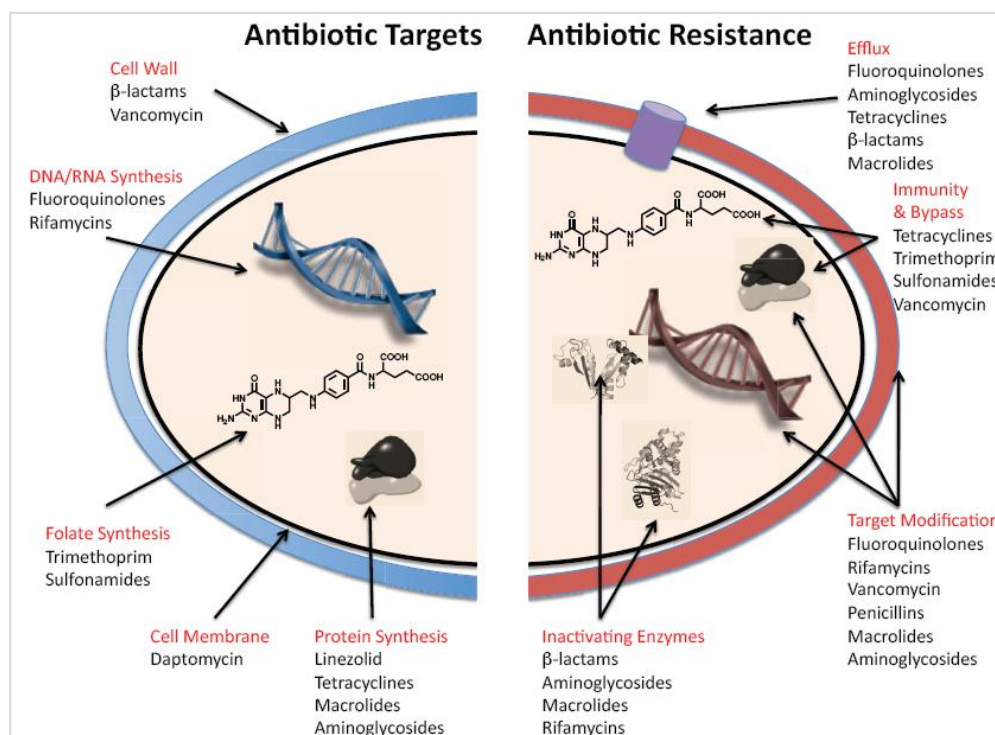


Figura 4: Esquema dos locais de actuação e mecanismo de resistência dos diferentes grupos de antibióticos (<http://www.biomedcentral.com>).

Desde a sua introdução na terapia humana há 60 anos, os antibióticos têm-se revelado um sucesso notável, constituindo uma das invenções médicas mais relevantes na redução da morbidade e da mortalidade humana.

Infelizmente o seu uso intensivo e indevido, resultou na resistência aos antibióticos por parte de diversos microrganismos patogênicos humanos, reduzindo as possibilidades no tratamento de infecções e restringindo o seu uso, por exemplo em transplantes de órgãos e implantes de próteses, onde as complicações infecciosas são comuns e a terapêutica antibiótica é necessária para prevenir ou tratar estas infecções (Martinez JL 2009).

Os mecanismos pelos quais as bactérias conseguem resistir à acção dos antibióticos são muito diversificados, mas podem ser agrupados em dois tipos, intrínsecos e adquiridos. Os primeiros são codificados no cromossoma bacteriano e transmitidos de geração em geração, ou seja por transferência vertical de genes (<http://www.biomedcentral.com>; Cunha JGS.1999). Por exemplo, a relação entre os antibióticos inibidores da síntese da parede celular, como as penicilinas e o género *Mycoplasma*. Estes microrganismos não possuem parede celular, logo estes antibióticos não encontram alvo para a sua acção (Martinez JL 2009).

Os segundos, hoje em dia mais preocupantes, resultam da mutação de genes próprios ou da aquisição de novos genes transferidos de outras bactérias por elementos móveis como os plasmídeos, integrões ou os transposões (conjugação) e os bacteriófagos (transdução), ou seja através da transferência horizontal de genes (<http://www.biomedcentral.com>; Cunha JGS.1999).

Os meios que as bactérias possuem para conseguir efectivar a resistência aos antibióticos, podem resumir-se em (figura 4):

- Inactivação do antibiótico através da produção de enzimas;
- Alteração ou excesso de produção das moléculas alvo do antibiótico;
- Diminuição da permeabilidade da parede celular;
- Eliminação activa (efluxo) do antibiótico para o exterior da bactéria (<http://www.biomedcentral.com>; Cunha JGS.1999; Nikaido H 2009).

1.2.1 Resistência Adquirida

1.2.1.1 Plasmídeos

Os plasmídeos são pequenas moléculas de DNA geralmente circular extracromossomal, que estão localizados no citoplasma das células bacterianas e que possuem a capacidade de replicação autónoma. São caracterizados por possuírem algumas propriedades tais como, ter uma origem de replicação, possuírem Múltiplos Sítios de Clonagem (MSC), ou seja, vários locais únicos de clivagem para endonucleases de restrição e genes que conferem resistência a antibióticos, responsáveis por processos de virulência, toxinas, produção de antibióticos, entre outros (Figura 5) (Carattoli A 2009).

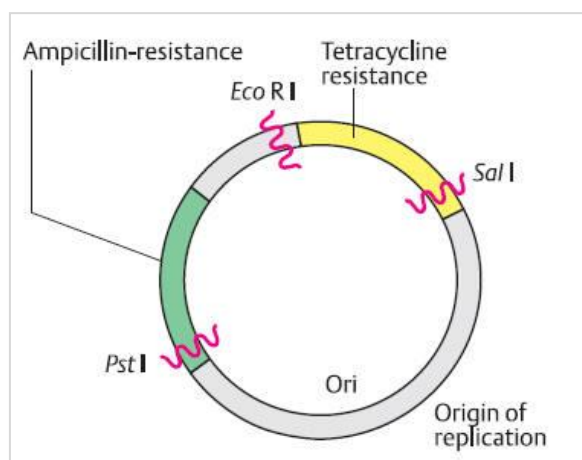


Figura 5: Plasmídeo com sequências que conferem resistência à ampicilina e tetraciclina, uma origem de replicação (ori) e sítios de restrição (EcoRI, SalI e PstI) (<http://users.med.up.pt>)

1.2.1.2 Integrões

Os integrões são caracterizados pela presença do gene *intl* que codifica a enzima integrase, um local de recombinação (*attI*) e um forte promotor (Figura 6).

Diversos estudos defendem a hipótese de que os integrões têm uma grande responsabilidade na propagação da resistência nos Gram negativos aos antibióticos, através da sua capacidade de capturar cassetes de genes do ambiente e incorporá-los em locais específicos de recombinação (Henriques IS *et al* 2006).

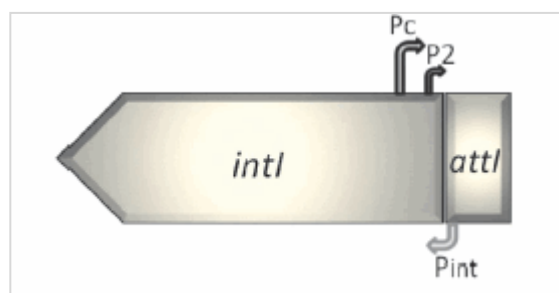


Figura 6: Estrutura Básica de um integrão. *Intl* (codifica a enzima integrase), *attI* (local de recombinação) e PC P2 (Potenciais promotores, devidamente orientados para a expressão de cassetes inseridas) (Di Conza JA *and* Gutkind GO 2010).

1.2.1.3 Transposições

Transposições são elementos genéticos móveis que podem conter vários Kbp de DNA, incluindo a informação necessária para a sua migração de um *locus* genético para outro. Os transposições relativamente curtos, conhecidos como sequências de inserção (SI) transportam unicamente os genes para as enzimas necessárias para promover a sua própria transposição.

Quase todas as bactérias possuem elementos de SI e cada espécie abriga os seus próprios elementos característicos.

Os transposições complexos contêm genes para funções especializadas, como para a resistência a antibióticos, e são flanqueados SI.

Ao contrário dos plasmídeos, os transposições não contêm informação genética necessária para a sua própria replicação. Necessitam por isso de um plasmídeo ou de um bacteriófago para passarem de uma célula para a outra (Norman A *et al* 2009; Brooks GF *et al* 2005).

1.2.1.4 Interação entre elementos móveis

Os plasmídeos para além de transportarem genes de resistência, podem servir de veículos para outros elementos genéticos móveis como representa a figura 7.

Uma cassete de genes pode ser inserida num integrão, mediada pela enzima integrase no local específico de recombinação. O integrão pode ser inserido num transposão e este por sua vez em elementos de dispersão como os plasmídeos conjuntivos. Os plasmídeos têm capacidade de auto-replicação e a sua informação genética pode ser transferida por transformação ou conjugação. (Norman A *et al* 2009).

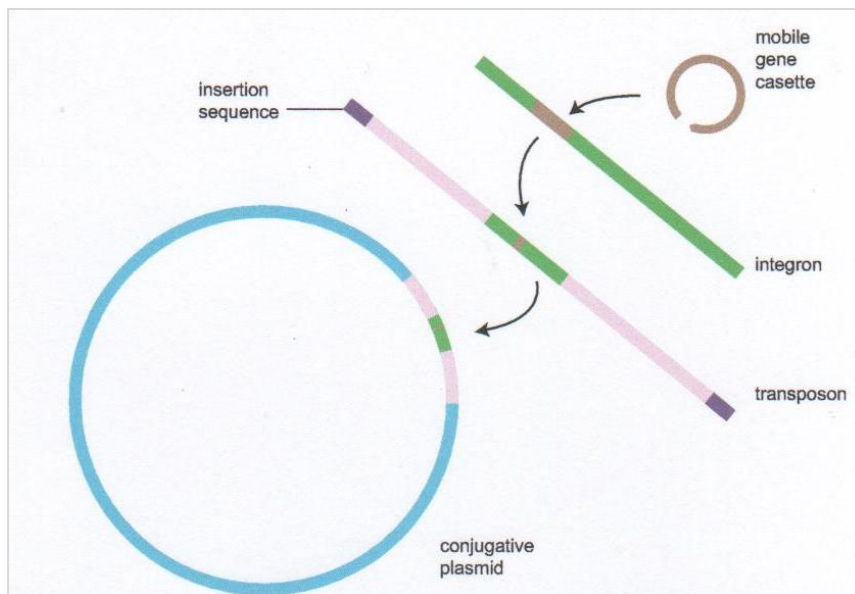


Figura 7: Interação entre os diferentes elementos genéticos móveis (Norman A *et al* 2009).

1.2.2 β -lactâmicos: características, modo de acção e mecanismos de resistência

Os β -lactâmicos são um dos grupos de antibióticos mais importantes, quer pelo número existente, quer pelo uso generalizado e ainda pela sua baixa toxicidade para os animais, incluindo o Homem.

Este grupo possui a característica comum de exibir um anel β -lactâmico constituído por 3 átomos de carbono e um nitrogénio (azoto) com radicais substituintes (Figura 8) (Sousa J 2006; Rawat D and Nair D 2010).

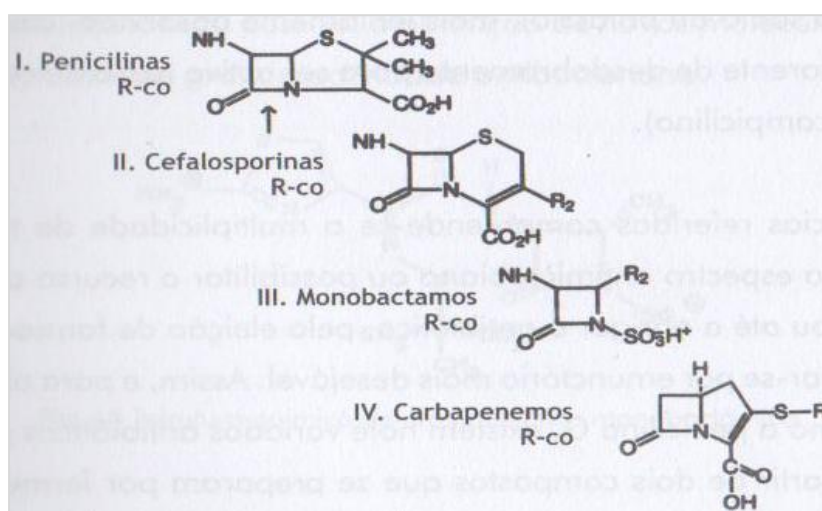


Figura 8: Estrutura química dos principais grupos dos β -lactâmicos (Sousa J 2006).

Todos os fármacos β -lactâmicos são inibidores selectivos da síntese da parede celular bacteriana e, portanto, mostram-se activos contra bactérias em crescimento (Brooks GF 2005). São por isso conhecidos como antibióticos antiparietais e actuam especificamente na fase final da biosíntese do peptidoglicano.

A biosíntese do peptidoglicano, na fase parietal, requer a quebra de ligações covalentes, por acção das autolisinas bacterianas, de modo a permitir a inserção de novos monómeros de peptidoglicano recém-sintetizados. Estes novos monómeros são sintetizados no citoplasma da célula bacteriana e transportados através da MC. A biosíntese de peptidoglicano ocorre pela intervenção das enzimas D-D-carboxipeptidases-transpeptidases, que promovem o estabelecimento de pontes interpeptídicas (*cross-linking*) entre cadeias peptídicas vizinhas do peptidoglicano em crescimento.

Os antibióticos β -lactâmicos inibem irreversivelmente estas enzimas colectivamente conhecidas por **PBPs** (*Penicillin-Binding-Proteins*), impedindo os *cross-linking*. O número de PBPs e a natureza destas proteínas varia de espécie para espécie bacteriana.

Para que a acção dos β -lactâmicos ocorra é necessário que haja a penetração destes na parede celular das bactérias, como se pode visualizar através da figura 9 (Sousa J 2006; Nikaido H 2009).

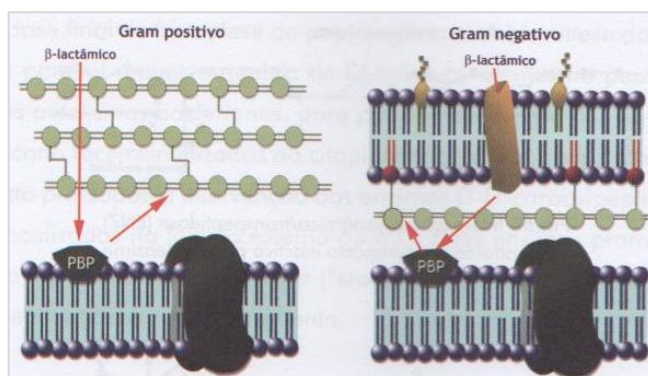


Figura 9: Penetração da PC das bactérias Gram positivas e Gram negativas por β -lactâmicos (Sousa J 2006).

Na tabela 1 são referidos os antibióticos β -lactâmicos administrados no Hospital Visconde de Salreu (HVS).

Tabela 1: Antibióticos β -lactâmicos usados no Hospital Visconde de Salreu (HVS).

Penicilinas		Cefalosporinas
Penicilinas Naturais	Penicilinas semi-sintéticas	Cefalotina/cefapirina (1ª geração)
Penicilina G ou Benzilpenicilina	Meticilina	Cefuroxima / Axetil-cefuroximo (2ª geração)
	Isoxazolilpenicilinas (a-oxacilina)	Cefotaxima (3ª geração)
	Aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina)	Ceftazidima (3ª geração)
	Amoxicilina + Ac. clavulânico	Cefepime (4ª geração)
	Ampicilina + Sulbactam	
	Ureidopenicilinas ou acilaminopenicilinas (piperacilina, piperacilina + tazobactam)	
	Carbapenemes (imipeneme e meropeneme)	
	Monobactâmicos (aztreonam)	

A acção dos antibióticos β -lactâmicos pode tornar-se ineficaz por vários mecanismos: alteração do alvo de actuação (as PBPs), impermeabilização da membrana externa nos bacilos Gram negativos, bombas de efluxo e inactivação enzimática por β -lactamases.

A alteração das PBPs, tem como consequência uma redução marcada da afinidade para o antibiótico. Este mecanismo está implicado na resistência à penicilina de *Pneumococco*, *Gonococco* e *Meningococcus* e na resistência à meticilina de *Staphylococcus*.

As bactérias Gram negativas podem dificultar a penetração dos antibióticos β -lactâmicos por modificação dos canais de porina, impedindo assim o acesso às PBPs, como acontece na resistência de algumas *Pseudomonas* aos carbapenemos (Cunha JGS.1999; Sousa J 2006; Rawat D and Nair D 2010).

As bombas de efluxo foram o último mecanismo de resistência a ser identificado (Poole K 2005).

O efluxo ocorre por intermédio de uma grande família de proteínas que funcionam como bombas que ejectam os antibióticos a partir do interior da célula (<http://jac.oxfordjournals.org/content/51/1/9.full>).

A inactivação por β -lactamases resulta da produção de enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico dando origem ao ácido penicilóico (Cunha JGS.1999). Porém, este mecanismo pode ser contrariado pela associação de inibidores das β -lactamases, tais como, a combinação da ampicilina com o sulbactam, amoxicilina e ticarcilina com o ácido clavulânico e a piperacilina com o tazobactam.

Estes inibidores ligam-se às β -lactamases de uma forma reversível ou irreversível e protegem o anel β -lactâmico de ser hidrolisado (Nicolas-Chanoine MH 1997).

1.2.2.1 A resistência por acção de β -Lactamases

O uso intensivo de antibióticos na medicina humana e veterinária, na aquacultura e na agricultura têm vindo a contribuir para a selecção e disseminação de microrganismos resistentes a antibióticos.

Nas últimas décadas a emergência de bactérias patogénicas resistentes a antibióticos, em ambiente clínico, tornou-se um sério problema mundial.

Os β -lactâmicos são os antimicrobianos mais usados no tratamento de infecções humanas, assim como o seu uso na prática veterinária, através de doses subterapêuticas para prevenir doenças.

A resistência das bactérias aos β -lactâmicos, encontra-se frequentemente relacionada com a produção de β -Lactamases (Henriques IS et al 2006). Estas enzimas actuam provocando a hidrólise do anel β -lactâmico (Figura 10) (Leinberger DM et al 2010).

Dentro das β -Lactamases destacam-se as β -Lactamases de espectro alargado (ESBL). As ESBL são um grupo de enzimas em constante evolução que partilham a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração e aztreonam (excepto cefamicinas e carbapenemos), por hidrólise desses antibióticos, contudo ainda são inibidas pelos inibidores de β -Lactamases como o ácido clavulânico. O número total de enzimas até agora caracterizado foi superior a 200. Muitos microrganismos Gram negativos, como a *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* e outras *Enterobacteriaceae* estão incluídos no grupo de microrganismos produtores de ESBL, contribuindo para o aumento da residência hospitalar (Rawat D and Nair D. 2010).

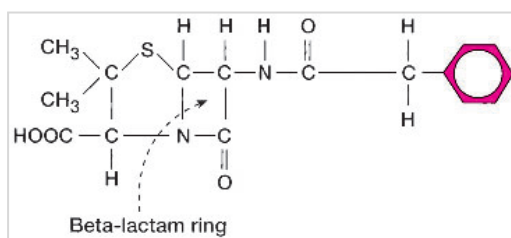


Figura 10: Anel β -lactâmico (Morello JA *et al* 2002).

1.2.2.2 Classificação das β -Lactamases

A classificação molecular de Ambler e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros são os dois sistemas mais frequentemente utilizados para classificar as β -lactamases.

O sistema de Ambler divide as β -lactamases em quatro classes principais (A a D) (Tabela 2). Este baseia-se na homologia das proteínas (similaridade dos aminoácidos) e não nas características fenotípicas. As β -lactamases de classes A, C e D são serina β -lactamases. Em contraste, as enzimas da classe B são metalo- β -lactamases.

Com exceção das enzimas tipo - OXA (que são enzimas da classe D), as ESBLs pertencem à classe molecular A (Rawat D and Nair D 2010).

Tabela 2 – Classificação das β -lactamases de acordo com Bush (Bush K and Jacoby GA 2010).

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxymino- β -lactams	GCI, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxymino- β -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxymino- β -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and ceftiofame	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxymino- β -lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxymino- β -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

^a CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

^b NI, not included.

O Bush-Jacoby-Medeiros classifica as β -lactamases de acordo com semelhanças funcionais (substrato e perfil inibidor). Existem quatro grupos principais e múltiplos subgrupos neste sistema de classificação (Tabela 3). Este sistema de classificação considera as β -lactamases e substratos β -lactâmicos que são clinicamente relevantes.

Nesta classificação as ESBLs pertencem ao grupo 2be ou 2d grupo (tipo-OXA) (Rawat D and Nair D 2010).

Tabela 3: Famílias de β -lactamases de maior importância clínica (Bush K and Jacoby GA 2010).

Enzyme family ^a	Functional group or subgroup	No. of enzymes ^{b,c}	Representative enzymes
CMY	1, 1c	50	CMY-1 to CMY-50
TEM	2b, 2be, 2br, 2ber	172	
	2b	12	TEM-1, TEM-2, TEM-13
	2be	79	TEM-3, TEM-10, TEM-26
	2br	36	TEM-30 (IRT-2), TEM-31 (IRT-1), TEM-163
	2ber	9	TEM-50 (CMT-1), TEM-158 (CMT-9)
SHV	2b, 2be, 2br	127	
	2b	30	SHV-1, SHV-11, SHV-89
	2be	37	SHV-2, SHV-3, SHV-115
	2br	5	SHV-10, SHV-72
CTX-M	2be	90	CTX-M-1, CTX-M-44 (Toho-1) to CTX-M-92
PER	2be	5	PER-1 to PER-5
VEB	2be	7	VEB-1 to VEB-7
GES	2f	15 ^d	GES-2 to GES-7 (IBC-1) to GES-15
KPC	2f	9	KPC-2 to KPC-10
SME	2f	3	SME-1, SME-2, SME-3
OXA	2d, 2de, 2df	158	
	2d	5	OXA-1, OXA-2, OXA-10
	2de	9	OXA-11, OXA-14, OXA-15
	2df	48 ^e	OXA-23 (ARI-1), OXA-51, OXA-58
IMP	3a	26	IMP-1 to IMP-26
VIM	3a	23	VIM-1 to VIM-23
IND	3a	8	IND-1, IND-2, IND-2a, IND-3 to IND-7

^a Enzyme families include those for which numbers have been assigned based on primary amino acid structures (G. Jacoby and K. Bush, <http://www.lahey.org/Studies/>).

^b Compiled through December 2009.

^c The sum of the subgroups in each family does not always equal the total number of enzymes in each family, because some enzyme numbers have been withdrawn, and some enzymes have not been assigned a functional designation by the investigators who provided the amino acid sequence.

^d GES-1, unlike other members of the GES family, has little detectable interaction with imipenem (49).

^e Nine clusters of OXA carbapenemases with their individual members have been designated in Table 6 in reference 52.

1.2.3 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos estão entre os antibióticos de amplo espectro mais usados na clínica anti-infecciosa. A maioria dos aminoglicosídeos são bacteriostáticos, possuem uma farmacocinética previsível e muitas vezes são usados em sinergia com outros antibióticos, propriedades que os tornam valiosos na luta contra as infecções. Isto acontece, apesar do seu potencial de toxicidade renal e da resistência bacteriana desenvolvida ao longo dos anos (Kotra LP *et al* 2000).

Os aminoglicosídeos são constituídos por dois ou mais açúcares aminados unidos por ligações glicosídicas a um núcleo aminociclitol (Figura 11), designados por isso de aminoglicosídeos-aminociclitolis, embora vulgarmente conhecidos somente por aminoglicosídeos. Possuem açúcares hidrofílicos com múltiplos grupos amino, protonados a pH fisiológico, funcionando portanto como moléculas policatiónicas e facilitando a ligação às regiões polianiónicas de rRNA 16S na subunidade 30S ribossomal (Kotra LP *et al* 2000; Sousa J 2006) .

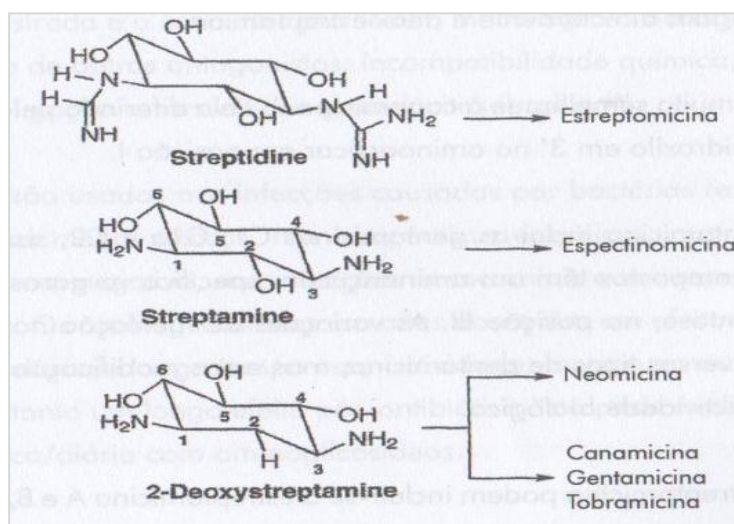


Figura 11: Classificação dos aminoglicosídeos baseados na estrutura química (Sousa J 2006).

Os aminoglicosídeos são antibióticos que agem inibindo a síntese proteica, através da ligação irreversível à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, impedindo a iniciação da síntese peptídica.

Para que este efeito seja exercido ao nível do ribossoma, o transporte transmembranar de aminoglicosídeos faz-se acoplado ao fluxo electrónico através da cadeia respiratória, ocasionando um efluxo de prótons para o periplasma. Tal facto cria um potencial membranal electronegativo, associado a um gradiente protónico e a um gradiente de pH.

A necessidade de oxigénio para a sua actividade anti-bacteriana explica a total ineficácia contras bactérias anaeróbias (Sousa J 2006).

A sua acção dos aminoglicosídeos pode tornar-se ineficaz por três mecanismos: inactivação por enzimas (acetilases, nucleotidases e fosforilases) modificadoras da estrutura do antibiótico, alteração da permeabilidade da célula bacteriana e modificação do ribossoma (Cunha JGS.1999).

1.2.4 Quinolonas

As quinolonas, antibióticos de síntese química, foram descobertas acidentalmente em 1958, quando se observou que um produto secundário da síntese da cloroquina, 7-cloroquinolina, tinha propriedades bactericidas. Anos mais tarde, em 1962, a primeira quinolona, o ácido nalidíxico foi usado no tratamento da cistite causada por bactérias Gram negativas. Na década de 80 são criadas as 6-fluorquinolonas, revolucionando o tratamento das infecções. Actualmente já se conta com a 4ª geração de quinolonas (Labetoulle M and Chiquet C 2008)

As fluoroquinolonas exibem um ácido carboxílico na posição 3 e a ligação C=O na posição 4 do anel naphitridina para manter as propriedades de antibiose (Figura 12).

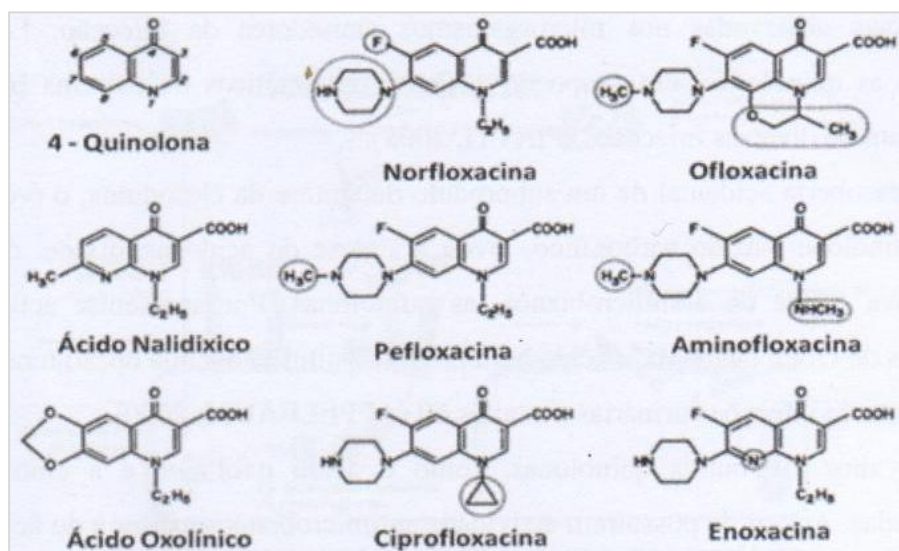


Figura 12: Estrutura química do ácido nalidíxico e de seis fluoroquinolonas (adaptado de Wolfson JS and Hooper DC 1984).

Estes antibióticos possuem uma actividade de amplo espectro contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e micobactérias patogénicas (Poole K 2005).

O seu mecanismo de acção corre através da interacção com as topoisomerases do tipo II (DNA girase e topoisomerase IV). A DNA girase, codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB* é a enzima responsável por induzir o superenrolamento no DNA (superenrolamento negativo), enquanto a topoisomerase IV, codificada pelos genes *parC* e *parE*, está envolvida no relaxamento e separação do DNA.

Ao actuarem contras as topoisomerases, as fluorquinolonas interferem com o enrolamento do DNA, impedindo a replicação e a transcrição do DNA (Sousa J 2006).

Relacionado com este mecanismo de acção, as bactérias desenvolveram diversas formas de resistência. São elas:

- a) mutações no alvo (*GyrA/GyrB* para DNA gyrase e *ParC/ParE* para a topoisomerase IV);
- b) diminuição do acesso ao próprio alvo, quer pela diminuição da permeabilidade, quer pelo aumento da expressão das bombas de efluxo, como o *AcrBB* e *MexAB*;
- c) presença de proteínas resistentes às fluoroquinolonas. Estas proteínas são codificadas por genes transmitidos através de plasmídeos, especialmente em *Enterobacter spp*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Considera-se por enquanto que o *Proteus mirabilis* e as bactérias Gram negativas não fermentadoras (*Acinetobacter spp* e *Pseudomonas aeruginosa*) não estão envolvidas neste tipo de resistência;
- d) enzima AAC(6')-Ib-cr, que representa a primeira enzima capaz de inactivar por acetilação duas classes de antibióticos, as fluorquinolonas e os aminoglicosídeos;
- e) por último, as bombas de efluxo mediadas por plasmídeos, codificadas pelo gene *gcpA*, que actuam através de um mecanismo selectivo. Apenas a norfloxacin e a ciprofloxacina são afectadas por este mecanismo de resistência (Luzzaro F 2008).

1.2.5 Sulfonamidas e Trimetoprim

As sulfonamidas (Figura 13) foram o primeiro grupo de agentes antimicrobianos introduzidos na prática clínica, em 1935. O trimetoprim (TMP) foi introduzido em 1935 e em 1968 utilizou-se pela primeira vez a combinação de sulfametaxazol-trimetoprim (SXT).

Esta combinação é principalmente indicada para o tratamento de infecções com a *E. coli* e outras espécies da família das *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e indicada nas infecções contra os principais agentes patogénicos do tracto respiratório superior, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*.

Por ser uma droga barata, o SXT é utilizado em larga escala nos países em desenvolvimento (Carlson P *et al* 2008)

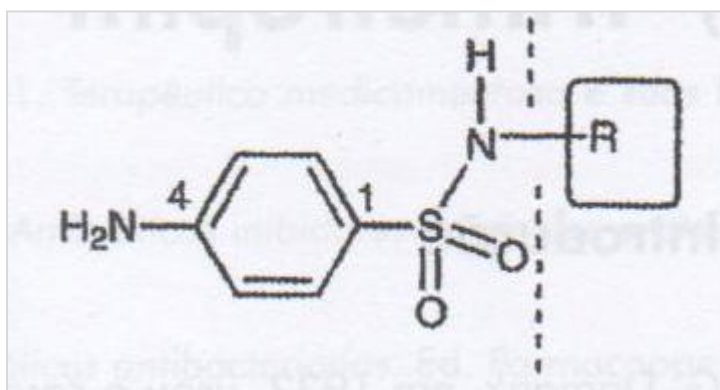


Figura 13: Estrutura geral das sulfonamidas (Sousa J 2006).

As sulfonamidas normalmente são administradas com o trimetoprim, porque os dois compostos em associação impedem duas etapas sucessivas da mesma via metabólica (Figura 14).

As sulfonamidas substituídas são derivados da *para*-aminobenzenossulfonamida, com actividade bacteriana devida a um antagonismo metabólico com o ácido *para*-aminobenzóico, o qual é utilizado pelas bactérias na biossíntese do ácido fólico.

O ácido *para*-aminobenzóico origina, por acção da enzima di-hidropteroato sintetase, o ácido di-hidropteroico. Como o ácido *para*-aminobenzóico e as sulfonamidas são estruturalmente semelhantes, estes fármacos poderão inibir a enzima.

O trimetoprim funciona como um potente inibidor competitivo da enzima di-hidrofolato redutase impedindo a produção do ácido tetrahidrofólico.

O ácido fólico é essencial na produção de constituintes do DNA e do RNA, tanto nas bactérias, como nos mamíferos. Contudo, os mamíferos obtêm o ácido fólico unicamente através da sua dieta, enquanto as bactérias são obrigadas a sintetizá-lo (Master:2003).

Assim as sulfonamidas e o trimetoprim exercem o seu efeito bacteriostático, impedindo o crescimento por carência de ácido fólico, indispensável para o crescimento celular (Sousa J 2006).

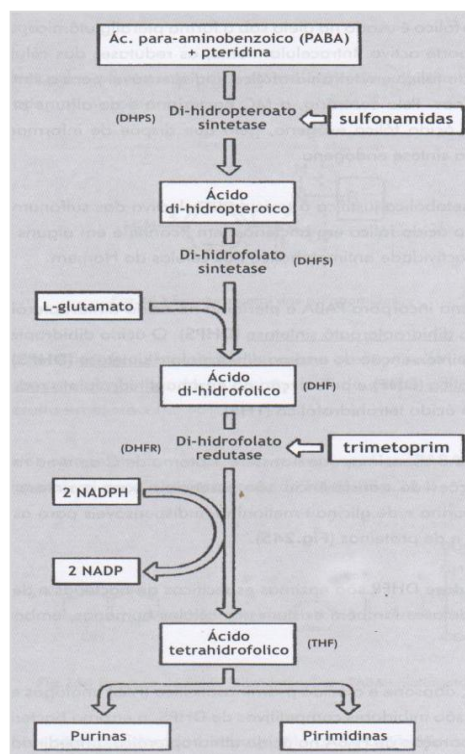


Figura 14: Esquema da via de síntese do ácido fólico e locais de acção dos antibióticos sulfonamidas e trimetoprim (Sousa J 2006).

No início dos anos 70 o SXT revelou um elevado espectro de actividade contra bactérias aeróbias. A sua eficácia antimicrobiana e o seu baixo custo rapidamente fizeram com que se tornassem antibióticos de eleição para o tratamento de inúmeras infecções (Masters PA *et al* 2003). No entanto, durante as últimas décadas tem-se verificado um aumento da resistência bacteriana.

Diversos mecanismos podem justificar estas resistências como a: concentração intracelular fraca dos fármacos, por impermeabilização da ME ou devido a bombas de efluxo, por exemplo resistência intrínseca de *Pseudomonas aeruginosa*; mutações enzimáticas na célula bacteriana, nomeadamente nas enzimas di-hidropteroato sintetase, di-hidrofolato redutase, diminuindo a afinidade para as sulfonamidas e trimetoprim, respectivamente; e resistência adquirida por plasmídeos que codificam a produção das enzimas alvo, tornando-as resistentes (Sousa J 2006).

1.3 A espécie bacteriana *Proteus mirabilis*

A primeira descrição do *Proteus* como bactéria responsável por causar putrefacção nos organismos superiores foi feita em 1885, por Hauser. Actualmente, sabe-se, que estes bacilos são patogénicos oportunistas para os seres humanos, causando infecções principalmente em pessoas anatomica e fisiologicamente debilitadas. Sublinha-se, no entanto, que estas bactérias são em geral menos virulentas, por exemplo, que a *E. coli*.

O género *Proteus*, pertence à família das *Enterobacteriaceae*, são Gram negativos, geralmente muito móveis, polimórficos, medindo 0,4-0,8 μm de diâmetro e 1,0 mm a 80 mm de comprimento. Encontram-se no solo, na água e em materiais com contaminações fecais. A principal característica que os distingue dos restantes membros da sua família é *swarming phenomenon*. Estes apresentam um crescimento *swarming*.

Os *Proteus* possuem fímbrias e flagelos, que são importantes factores de virulência, utilizados na adesão e penetração às células epiteliais e factores de patogenia como a urease, enzima que hidrolisa a ureia em amónia e dióxido de carbono, hemolisinas e endotoxinas que actuam na última fase das infecções (sepsis) (Figura 15) (Rózalski A *et al* 1997; (<http://www.bacterio.cict.fr/p/proteus.html>)).

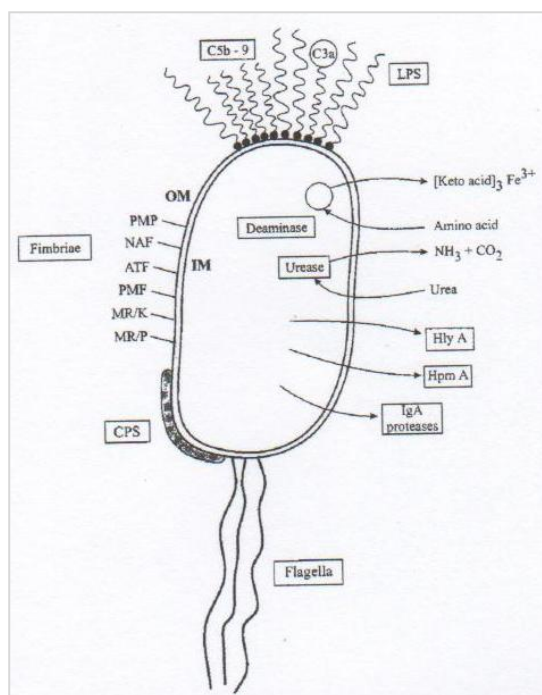


Figura 15: Factores de virulência do género *Proteus* spp (Rózalski A *et al* 1997).

Actualmente o género *Proteus* resume-se a 5 espécies: *Proteus hauseri*, *Proteus mirabilis*, *Proteus myxofaciens*, *Proteus penneri* e *Proteus vulgaris*, mais 3 espécies ainda não classificadas. (<http://www.bacterio.cict.fr/p/proteus.html>).

Destas há a destacar 4 espécies, *Proteus mirabilis*, *Proteus myxofaciens*, *Proteus penneri* e *Proteus vulgaris*. As principais características que os distinguem estão resumidas na figura 16. O *Proteus mirabilis* é a única espécie que afecta os humanos que não produz indol, esta característica permite distingui-lo laboratorialmente do *Proteus vulgaris* (Koneman EW).

Biochemical Test	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. myxofaciens</i>	<i>P. penneri</i>	<i>P. vulgaris</i>	
				Bio 2	Bio 3
Indole	-	-	-	+	+
Ornithine decarboxylase-Moeller's	+	-	-	-	-
Esculin hydrolysis	-	-	-	+	-
Fermentation of:					
Maltose	-	+	+	+	+
Xylose	+	-	+	+	+
Salicin	-	-	-	+	-
Chloramphenicol susceptibility	S	S	R	V	S
+ = 90% or more strains +; - = 90% or more strains neg					

Figura 16: Principais características fenotípicas de 4 espécies de *Proteus* (Koneman EW).

O *Proteus mirabilis* é a espécie que mais frequentemente afecta os humanos, particularmente como agente causador de infecções no tracto urinário e em feridas (Koneman EW).

1.4 Genotipagem – por métodos envolvendo amplificação por PCR

Polymerase chain reaction (PCR) é uma técnica desenvolvida pelo bioquímico Kary Mulis (Campos LS 2002). Consiste numa reacção bioquímica *in vitro* que permite a síntese de grandes quantidades de uma sequência alvo de ácidos nucleicos.

O procedimento requer DNA do organismo a ser tipado, dois *primers* complementares, que são concebidos para acompanhar a sequência do DNA do molde a ser amplificada e uma DNA polimerase termoestável.

Os *primers* servem como ponto de partida para a polimerase adicionar as bases, para formar uma cadeia que é complementar ao modelo.

Cada ciclo de amplificação é constituído por uma fase de desnaturação, em que a cadeia dupla de DNA é separada em duas cadeias simples, pela fase de hibridação, onde os *primers* de

oligonucleótidos se ligam à sequência alvo da cadeia simples de DNA e pela fase de extensão. É durante a fase de extensão, que o número de cópias de DNA é amplificado (Singh A *et al* 2006).

Existem diversas variantes metodológica para amplificação de genes por PCR, entre elas podemos destacar:

- a) **Specific PCR**, é a abordagem mais simples da técnica de PCR, a qual foi projectada para detectar microrganismos alvo específicos. Neste caso os *primers* são escolhidos em função da molécula de DNA alvo do microrganismo conhecido. Este método pode ser usado para detecção directa e método de identificação;
- b) **Multiplex PCR**, é um método onde 2 ou mais pares de *primers* são incluídos numa reacção e em que 2 ou mais sequências de DNA, são alvo em simultâneo. Permite detectar algumas bactérias diferentes numa só reacção de PCR;
- c) **Nested/Seminested PCR**, nesta abordagem o DNA genómico alvo é amplificado através de 2 conjuntos de *primers*. O primeiro conjunto de *primers* produz produtos de PCR mais longos do que o segundo conjunto. Durante o segundo estágio de amplificação, o segundo conjunto de *primers*, utiliza os produtos de PCR como DNA molde para amplificar uma região interna de DNA;
- d) **Broad Range PCR**, é um método muito útil para a detecção universal de microrganismos. Os *primers* da ampla gama de PCR são seleccionados das regiões conservadas de um gene particular que é compartilhado por um determinado grupo taxonómico. Por exemplo, é o que acontece com o gene 16S rRNA, que é encontrado em todas as bactérias e que contém algumas sequências de regiões conservadas;
- e) **RT-PCR** (*Reverse transcription-polymerase chain reaction*) é a técnica de síntese de cDNA a partir de RNA. Primeiro através de transcrição reversa (RT), seguida da amplificação do cDNA alvo por PCR;
- f) **Real-time PCR**, este método baseia-se no uso de sondas fluorescentes para detectar, confirmar e quantificar os produtos de PCR que estão a ser gerados em tempo real (Millar BC *et al* 2007).

1.5 Os RNAs Ribossomais

Nas bactérias existem três genes que compõem a funcionalidade do rRNA. São eles o 5S rRNA, 16S rRNA e 23S rRNA.

O 16S rRNA, tem sido ao longo da história, o gene mais utilizado para efeitos de identificação, por se encontrar altamente conservado e por existir um número moderado de cópias dependendo do género. Este gene está presente em todas as bactérias e acumula mutações a um ritmo muito lento e constante ao longo do tempo, podendo portanto ser usado como “relógio molecular”.

Porções altamente variáveis da sequência 16S rRNA, proporcionam uma identidade única a qualquer bactéria e ainda informações úteis sobre a relação entre elas. Contudo, existem também importantes sequências de regiões conservadas que estão presentes em todas as bactérias conhecidas.

Os *primers* utilizados no método *Broad Range PCR* podem ser projectados para reconhecer sequências conservadas do gene 16S rRNA e utilizados na amplificação de regiões variáveis ou de diagnóstico, sem ser necessário conhecer qualquer sequência ou informação prévia sobre a filogenética de um isolado bacteriano desconhecido (Millar BC *et al* 2007).

2 Contexto e Objectivos do presente trabalho

1. Contexto

Este trabalho foi realizado no Hospital Visconde de Salreu (HVS) no Laboratório de Patologia Clínica e surgiu na sequência de um trabalho realizado em 2003 que consistiu em conhecer o perfil bacteriológico das infecções provenientes de feridas operatórias e úlceras de pressão e as respectivas sensibilidades aos antibióticos.

Achou-se por isso pertinente continuar este estudo de modo a proporcionar ao HVS mais uma ferramenta de trabalho na luta contra as infecções.

2. Objectivos

Tendo em conta os antecedentes, o presente estudo dividiu-se em três objectivos distintos:

- A) Efectuar um estudo retrospectivo dos anos de 2008 e 2009, sobre o perfil de resistência dos microrganismos mais isolados de feridas operatórias e úlceras de pressão e comparar com o período de 1998 a 2002;
- B) Isolar e identificar organismos multi-resistentes;
- C) Detectar a presença das β -lactamases TEM, SHV e CTX-M numa estirpe multi-resistente.

3. Material e Métodos

3.1 Resistência antimicrobiana em exsudatos

3.1.1 Caracterização da Unidade Hospitalar e do serviço

O Hospital Visconde de Salreu (HVS) tem como valências os Serviços de Internamento, num total de 50 camas, Cirurgia de Ambulatório, Bloco Operatório, Meios Complementares de Diagnóstico e Terapêutica, Farmácia, Serviço Social e Serviços Domiciliários. A Consulta Externa possui as especialidades de Anestesiologia, Cirurgia geral, Dor, Ginecologia, Hipertensão arterial, Imunoalergologia, Medicina Interna, Medicina Física e Reabilitação, Medicina do Trabalho, Oftalmologia, Ortopedia, Otorrinolaringologia, Patologia Clínica, Pediatria e Pneumologia.

O Serviço de Patologia Clínica do HVS é composto por 4 sectores: Hematologia, Bioquímica, Microbiologia e Imunologia/Endocrinologia. O funcionamento destes sectores é assegurado por um quadro constituído por uma médica, chefe de serviço, por uma técnica superior e por duas técnicas de diagnóstico e terapêutica e por uma administrativa. Este serviço funciona das 8 às 17h de Segunda a Sexta-feira.

3.1.2 Período e desenho

Realizou-se um estudo retrospectivo em 80 doentes, nos anos de 2008 e 2009, com pedido de cultura de exsudatos. Consideraram-se exsudatos as feridas operatórias e úlceras de pressão, provenientes do meio hospitalar (internamento) e extra-hospitalar (consulta externa). O número de amostras por doente varia entre 1 a 3, sendo o total de amostras de 124. Em todos os casos registou-se: idade, sexo, proveniência, resultado do exame cultural, identificação da estirpe bacteriana e o padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos.

De Janeiro a Março de 2010, do mesmo tipo de amostras e com a mesma proveniência, isolaram-se 10 bactérias multi-resistentes.

Foram consideradas como bactérias multi-resistentes, as bactérias que manifestavam resistência a pelo menos três famílias de antimicrobianos. O critério adoptado foi baseado no critério utilizado ao longo de anos no HVS.

3.1.3 Procedimentos laboratoriais

As amostras foram semeadas, com ansa calibrada de 10 μ l, pela técnica de esgotamento por quadrantes nos meios de Gelose MacConkey (BioMérieux), Gelose Sangue (BioMérieux), Gelose Chocolate (BioMérieux) e Manitol Salgado (BioMérieux). A placa de Gelose Chocolate foi incubada na estufa em atmosfera enriquecida com CO₂ a 37°C durante 24h. Enquanto as restantes placas foram incubadas em aerobiose nas mesmas condições. Após este período, avaliou-se o crescimento bacteriano nos meios.

Efectuaram-se 3 esfregaços de cada amostra para coloração de Gram, com o objectivo de auxiliar a identificação bacteriana.

Foram consideradas como positivas as amostras em que se observou crescimento de colónias.

3.1.4 Identificação dos isolados bacterianos e provas de susceptibilidade aos antimicrobianos

Quando existe mais que um tipo de colónias, procede-se à execução de um esfregaço para coloração de Gram de modo a facilitar o isolamento dos microrganismos por repicagem.

Após o isolamento do microrganismo, procede-se à sua identificação pelo sistema API (BioMérieux) e a sensibilidade aos antibióticos com o sistema ATB (BioMérieux).

O sistema de identificação API utiliza mini-testes bioquímicos padronizados e uma base de dados. As galerias comportam mini-tubos que contêm substâncias desidratadas. Os mini-tubos são inoculados com uma suspensão bacteriana, que reconstitui os meios. As reacções produzidas durante o período de incubação – 24 horas, traduzem-se pela mudança de cor espontânea ou revelada após a adição de reagentes.

As galerias ATB comportam de 16 grupos de 2 cúpulas. O primeiro grupo sem antibiótico, serve como controle de crescimento. Os 14 seguintes contêm antibióticos a uma ou duas concentrações. O último grupo sem antibiótico, permite, se for necessário, adicionar um antibiótico complementar.

O microrganismo a testar é colocado em suspensão em meio de cultura, depois é inoculado na galeria. Após 18-24 horas de incubação, realiza-se a leitura visualmente. Observa-se em cada cúpula a existência ou não de turvação. Se existir turvação o microrganismo desenvolveu-se, o que significa que houve resistência ao antibiótico testado. O resultado é dado como, **S**- Sensível, **R**- resistente ou **I**- Intermédio.

Para simplificar os cálculos e por razões de prática clínica corrente, adicionou-se os intermédios aos resistentes.

O estudo da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado de acordo com os antimicrobianos que normalmente são mais activos para cada grupo ou espécie em estudo. Assim para as *Pseudomonas*, testou-se a sensibilidade aos antimicrobianos: β -lactâmicos (piperacilina, piperacilina – tazobactam, imipenemo, amoxicilina, amoxicilina – ácido clavânico, ceftazidima e cefepime), aminoglicosídeos (gentamicina), quinolonas (ciprofloxacina) e sulfonamidas (cotrimoxazolo).

Para as *Enterobacteriaceae* estudou-se a susceptibilidade aos antimicrobianos: beta – lactâmicos (amoxicilina, amoxicilina – ácido clavânico, piperacilina, piperacilina – tazobactam, cefalotina, cefoxitina, ceftazidima, cefepime, imipenemo), sulfonamidas (cotrimoxazolo), aminoglicosídeos (gentamicina) e quinolonas (ciprofloxacina). Para *Staphylococcus* asseverou-se a sensibilidade aos antimicrobianos: β -lactâmicos (penicilina e oxacilina), sulfonamidas (cotrimoxazol), aminoglicosídeos (gentamicina), macrólidos (eritromicina), clindamicina, tetraciclina, vancomicina, teicoplanina e quinolonas (levofloxacina e norfloxacina).

3.1.5 Detecção da resistência à meticilina das estirpes de *Staphylococcus aureus*

Para a detecção dos *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) utilizou-se o *Kit* comercial *SLIDEX MRSA Detection*.

Este *Kit* baseia-se num teste rápido de aglutinação de partículas de látex que permite a detecção da resistência à meticilina por detecção da PBP2' (*penicillin-binding protein 2'*).

A proteína PBP2' é o produto de expressão do gene que codifica a resistência à meticilina (MecA).

Princípio

As partículas de látex sensibilizadas com o anticorpo monoclonal dirigido contra a PBP2' vão reagir após extracção especificamente com os MRSA, observando-se uma aglutinação visível a olho nu.

As estirpes de *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) não aglutinam as partículas de látex.

3.2 Detecção e Pesquisa de β -lactamases

As placas de microrganismos provenientes do HVS foram guardadas em ambiente refrigerado e repicadas sucessivamente para o meio de cultura Luria-Bertani broth (LB). Das placas armazenadas seleccionou-se para ser estudado um *Proteus spp.*

Meio de cultura Luria-Bertani broth (LB)

O meio LB (Luria-Bertani broth) é um meio não selectivo, utilizado para crescimento e manutenção de bactérias.

Composição do meio LB

Triptona	10g/l
Extracto de levedura	5g/l
Cloreto de sódio	10g/l
Agar	20g/l (para meios de cultura sólidos)

3.2.1 Extracção de DNA genómico a partir de células de culturas bacterianas

Soluções:

Tampão B1: 50 mM Tris-Cl pH 8.0/50mM EDTA pH 8.0/0,5% Tween 29/05% Triton X-100

- Dissolver 3.03g de Tris em 400 ml de H₂O, ajustar o pH 8.0 com HCl;
- Adicionar 50 ml 0.5M EDTA pH 8.0;
- Adicionar 2.5 ml Tween 20;
- Adicionar 2.5 ml Triton X-100;
- Perfazer o volume 500 ml com H₂O.

Tampão B2: 3M Cloridrato de guanidina/ 20% Tween 20

- Dissolver 286.59 g Cloridrato de guanidina em 700 ml H₂O;
- Adicionar 200 ml Tween 20;
- Perfazer o volume de 1000ml com H₂O.

Armazenar no frigorífico, pré-aquecer até à temperatura ambiente antes de usar.

RNase A: 100 mg/ml, solução QIAGEN pronta a usar.

Lisozima: 100mg/ml H₂O

Solução pode ser mantida congelada em pequenas aliquotas ou pode ser preparada antes de ser usada.

Protease: Dissolver QIAGEN – protease (7.5 AU em 7.5 ml de H₂O) e manter congelada em pequenas aliquotas.

Solução de ligação

Tampão de lavagem (NaCl, EDTA e Álcool)

TE_{0.1} (10mM Tris/HCl pH8, 01mM EDTA)

Procedimento

a) Lise das células

- Transferir as células da placa para 2 tubos de eppendorf (tubo 1 e 2);
- Adicionar 100 μ l do Tampão B1 e agitar vigorosamente até dissolver as células;
- Preparar um mastermix: Tampão B1 250 μ l + 0,5 μ l RNase A + 5 μ l Lisozima + 11,5 μ l Protease;
- Adicionar 100 μ l do mastermix ao tubo 1 e 2;
- Agitar vigorosamente no vortex e incubar 30min a 37°C;
- Adicionar 70 μ l do Tampão B2 ao tubo 1 e 2;
- Agitar vigorosamente e incubar 30min a 50°C.

a) Preparação do DNA

- Adicionar 500 μ l de Solução de ligação ao tubo 1 e 2;
- Agitar vigorosamente e incubar 5min a 55°C;
- Suspende a Sílica durante 1min;

- Adicionar 5 μ l de Silica;
- Incubar 5min a 55°C e inverter de quando em vez;
- Centrifugar 5s e desprezar o sobrenadante;
- Adicionar 500 μ l de Tampão de lavagem, centrifugar 5s e desprezar o sobrenadante (repetir a etapa 3 vezes);
- Retirar o excesso de álcool, deixar secar à temperatura ambiente durante 10 a 15min;
- Adicionar 100 μ l TE_{0.1} e incubar 5min a 55°C;
- Centrifugar 2min e recolher o sobrenadante (DNA genómico);
- Manter o DNA a 4°C.

3.2.2 Electroforese em gel de agarose - para visualização de DNA

Para a realização da electroforese utilizou-se o equipamento Horizon 11.14 e para a visualização do gel, um PC com o programa *Genesnap*.

Tabela 4: Marcadores e concentração do gel utilizado nas diferentes electroforeses

	Marcador	[] do gel de agarose %
DNA extraído de células bacterianas	GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas)	0,8
Gene 16S rDNA	GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas)	1
Genes β-lactamases TEM, SHV e CTX-M	GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas)	1,5

Soluções:

Tampão TAE IX (Tris acetato EDTA)

Lowding Buffer (azul de Bromofenol, xileno cianol, glicerol)

Brometo de Etidio (05 μ g/ml)

Procedimento

- Preparar o gel de agarose na concentração pretendida (agarose + tampão TAE IX);
- Marcar o gel de agarose com o pente;
- Misturar 5 μ l de DNA com 1.25 μ l de Lowding Buffer e 1.25 μ l de marcador com 3 μ l de H₂O;
- Colocar a amostra e o marcador nos respectivos poços;
- Definir as condições do aparelho (1h20min, 80V e 400A);
- No final electroforese, colocar o gel em Brometo de Etídio 20 min;
- Visualizar o gel de agarose.

3.2.3 Amplificação do gene 16S rDNA para identificação da estirpe

Para a amplificação do 16S rDNA utilizou-se a técnica de PCR.

Tabela 5: *Primers* e respectiva sequência para amplificação do gene 16S rDNA. (Henriques IS *et al* 2006).

Alvo	Par de <i>primers</i>	Sequência (5' - 3')
gene 16S rDNA	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT

Determinou-se o volume dos reagentes através da fórmula: **C1V1=C2V2**.

Volumes

Buffer (taq buffer 10x - (NH₄)₂ SO₄) 2,5 μ l

MgCl₂ (3mM) 3,0 μ l

dNTP 1,5 μ

Primer F 0,75 μ l

Primer R 0,75 μ l

DMSO 1,25 μ l

Taq 0,5 μ l

dH₂O 13,75 μ l

Preparou-se um mix com os reagentes, deste prepararam-se 2 tubos, um com 24 μ l mix + 1 μ l DNA e outro com 24 μ l mix +1 μ l dH₂O (controlo negativo).

O aparelho de PCR MycyclerTM – thermal cycler da Bio-rad foi programado para 3h, com o seguinte ciclo (Fonte: Manini e *et al*, 2008).

1x	94°C – 3'
35X	94°C – 1'
	55°C – 1'
	72°C – 2'
1X	72°C – 10''

3.2.4 Detecção de genes de β -lactamases por PCR

Tabela 6: Primers e respectiva sequência, controlo positivo e tamanho do gene para amplificação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} (Henriques IS *et al* 2006).

Alvo	Tamanho do gene (pb)	Par de primers	Sequência do primer (5' - 3')	Controlo Positivo
<i>bla</i> _{TEM}	425	TEM_F	AAAGATGCTGAAGATCA	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 6T
		TEM_R	TTTGGTATGGCTTCATTC	
<i>bla</i> _{SHV}	304	SHV_F	GCGAAAGCCAGCTGTCGGGC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 2s
		SHV_R	GATTGGCGGCGCTGTTATCGC	
<i>bla</i> _{CTX-M}	538	CTX_F	GTGCAGTACCAGTAAAGTTATGG	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Kp40
		CTX_R	CGCAATATCATTGGTGGTGCC	

Determinou-se o volume dos reagentes através da fórmula: **C1V1=C2V2**.

Volumes:

Buffer (taq buffer 10x - (NH₄)₂ SO₄) 2,5µl

MgCl₂ (3mM) 3,0 µl

dNTP 0,5 µl

Primer TEM_F 0,75 µl

Primer TEM_R 0,75 µl

DmSO 1,25 µl

Taq 0,5 μ l
dH₂O 13,75 μ l

Preparou-se um mix com os reagentes, deste prepararam-se 3 tubos, um com 24 μ l mix + 1 μ l DNA, outro com 24 μ l mix +1 μ l dH₂O (controlo negativo) e um terceiro 24 μ l mix +1 μ l de controlo positivo.

Utilizou-se o equipamento PCR Mycycler™ – thermal cycler da Bio-rad.

Ciclos de amplificação - fonte: Henriques IS *et al* 2006.

PCR *bla*_{TEM}

Tempo de amplificação 2:30h, ciclo:

1x 94°C – 9'
30X 94°C – 30''
44°C – 30''
72°C – 1'
1X 72°C – 10'

PCR *bla*_{SHV}

Tempo de amplificação 2:00h, ciclo:

1x 94°C – 9'
30X 94°C – 30''
62°C – 30''
72°C – 1'
1X 72°C – 10'

PCR *bla*_{CTX-M}

Tempo de amplificação 2:00h, ciclo:

1x 94°C – 9'
30X 94°C – 30''
55°C – 30''
72°C – 1'
1X 72°C – 10'

3.2.5 Limpeza de reacções de PCR para sequenciação

O objectivo da sequenciação serve para confirmar que microrganismo temos. A sequenciação foi feita na empresa STAB – VIDA sediada em Lisboa.

Para a limpeza das reacções, ou seja para a remoção dos restos de primers, taq, tampão, etc, utilizou-se o Kit jetquick – PCR product purification spin kit/250.

Soluções:

H1 (Hidroclorato de guanidina e isopropanol);

H2 (Etanol, NaCl, EDTA e Tris-HCl);

Procedimento

- Adicionar 400 μ l de H1 100 μ l reacção de PCR;
- Passar a mistura para uma coluna;
- Centrifugar 12,000x g durante 1min;
- Desprezar o liquido;
- Adicionar 500 μ l de H2;
- Centrifugar 12,000x g durante 1 min;
- Desprezar o liquido;
- Adicionar 25 μ l de H₂O a 65°C (ajuda a eluir o DNA retido na coluna);
- Esperar 1 min para eluir;
- Centrifugar 12,000x g durante 2min;
- Retira-se a coluna e o DNA encontra-se sedimentado.

4 Resultados

4.1 Resistência antimicrobiana em exsudatos

4.1.1 Amostras

Nos anos de 2008 e 2009 foram processados um total de 124 exsudatos. Destes 14,5% obtiveram um exame cultural negativo e 85,5% positivo, verificado através do crescimento de colónias (tabela 7).

Tabela 7: Exsudatos processados em 2008 e 2009 e respectivo exame cultural

Exsudatos (n=124)		
	<i>n</i>	%
Exame cultural positivo	106	85,5
Exame cultural negativo	18	14,5

Na tabela 8 estão representados os dados relativos à proveniência dos exsudatos e respectivo exame cultural.

Do total de exsudatos processados, 55 foram úlceras de pressão e 69 feridas operatórias. Do internamento colheram-se 20 amostras de doentes com úlceras de pressão e 9 de feridas operatórias. No internamento é corrente existir um grande número de doentes acamados que desenvolvem úlceras de pressão. Também existem doentes que após a alta clínica são reinternados, por infecções nas feridas operatórias.

Na consulta externa, a maior parte das amostras foram provenientes de doentes com feridas operatórias (n=60) e cerca de 35 com úlceras de pressão.

Do total de amostras de úlceras de pressão semeadas 92,7% foram positivas e 7,3% negativas, o que demonstrou que a maior parte dos doentes possuía infecção. O mesmo se verificou com as feridas operatórias, com 79,7% positivas e 20,3% negativas.

Grande parte das amostras negativas encontravam-se sujeitas a antibioterapia.

Tabela 8: Dados relativos à proveniência dos exsudatos processados e respectivo exame cultural.

Exsudatos (n=124)					
	<i>n</i>	<i>Internamento (n)</i>	<i>Consulta Externa (n)</i>	<i>Exame cultural positivo (%)</i>	<i>Exame cultural negativo (%)</i>
Úlceras de pressão	55	20	35	92,7	7,3
Feridas operatórias	69	9	60	79,7	20,3

4.1.2 Microrganismos Isolados

Das amostras colhidas isolaram-se 82 microrganismos das feridas operatórias e 91 das úlceras de pressão.

Na tabela 9 estão representadas as percentagens dos diferentes microrganismos isolados de ambas as amostras.

Os microrganismos mais isolados foram os *Staphylococcus aureus*. Destes, obteve-se maior percentagem de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes (MRSA), 26,8% nas feridas e 22,0% nas úlceras de pressão e uma menor percentagem de *Staphylococcus aureus* sensíveis à metilina (MSSA), 15,9% e 16,5%, feridas e úlceras de pressão respectivamente.

Nas úlceras de pressão isolou-se também um grande número de *Pseudomonas aeruginosa* (13,2%), *Proteus mirabilis* (8,8%) e Outras *Pseudomonas spp* (18,7%). As Outras *Pseudomonas spp* foram agrupadas devido à diversidade de estirpes isoladas em pequeno número.

Nas feridas operatórias, para além dos *S. aureus*, isolou-se em maior percentagem a *E. coli* (7,3%).

Tabela 9: Microrganismos isolados das amostras de feridas operatórias e de úlceras de pressão.

	Microrganismos isolados %	
	Feridas operatórias (n=82 microrganismos)	Úlceras de pressão (n=91 microrganismos)
MRSA + MSSA	42,7	38,5
MRSA	26,8	22,0
MSSA	15,9	16,5
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	4,9	13,2
<i>Proteus mirabilis</i>	3,7	8,8
<i>Escherichia coli</i>	7,3	3,3
<i>Staphylococcus.capitis</i>	2,4	3,3
<i>Enterobacter spp</i>	4,9	1,1
<i>Outras Pseudomonas spp</i>	4,9	18,7
<i>Staphylococcus. Cohnii</i>	3,7	0
<i>Staphylococcus hominis</i>	1,2	1,1
<i>Proteus vulgaris</i>	1,2	1,1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,4	1,1
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	1,2	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,2	0
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1,2	0
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2,4	0
<i>Staphylococcus simulans</i>	1,2	0
<i>Staphylococcus lentus</i>	1,2	0
<i>Neisseria spp</i>	2,4	0
<i>Serratia marcescens</i>	1,2	2,2
<i>Citobacter freundii</i>	1,2	0
<i>Tatumella ptyseos</i>	1,2	0
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1,2	0
<i>Proteus spp</i>	0	2,2
<i>Morganella morganii</i>	0	1,1
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	0	1,1
<i>A.calco varidans</i>	0	1,1

4.1.3 Perfil de resistência aos antimicrobianos

Fez-se o estudo do perfil de resistência aos antimicrobianos dos microrganismos mais isolados de exsudatos. Para simplificar os cálculos e por razões de prática clínica corrente, adicionou-se os resultados intermédios aos resistentes.

Na tabela 10 estão representadas as abreviaturas dos antibióticos utilizados para avaliar o perfil de resistência dos microrganismos.

Tabela 10: Abreviatura dos antibióticos de acordo com nomenclatura do *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Abreviatura	Antibiótico	Abreviatura	Antibiótico
PEN	Penicilina	PIP	Piperacilina
TSU	Cotrimoxazol	TZP	Piperacilina + Tazobactam
GEN	Gentamicina	IMI	Imipeneme
ERY	Eritromicina	FEP	Cefepime
CLI	Clindamicina	CIP	Ciprofloxacina
TET	Tetraciclina	AMX	Amoxicilina
CXM	Cefuroxime	MEM	Meropeneme
TIM	Ticarcilina+Ac. clavulânico	CTX	Cefotaxime
VAN	Vancomicina	AMC	Amoxicilina + Ac. clavulânico
TEC	Teicoplanina	CAZ	Ceftazidima
LVX	Levofloxacina	CEF	Cefalotina
OXA	Oxacilina	FOX	Cefoxitina
TOB	Tobramicina	AMK	Amicacina
TIC	Ticarcilina	CST	Colistina
NET	Netilmicina	SAM	Ampicilina+Subactam
MIN	Minociclina	RIF	Rifampicina
NOR	Norfloxacina	FUC	Ác.Fusídico
NIT	Nitrofurantoina	Q/D	Quinupristina/Dalfopristina
OXAE	Oxacilina coagulase -		

Na tabela 11 estão representados os dados relativos ao perfil de resistência dos MRSA e MSSA nas amostras de feridas operatórias e úlceras de pressão.

Quando comparados os MRSA, das duas amostras, verificou-se que em ambas, a sensibilidade à vancomicina era total e a resistência à oxacilina era de 100%. Obteve-se uma elevada resistência à penicilina e eritromicina. Nos restantes antibióticos verificou-se que os MRSA ofereceram mais resistência nas amostras de úlceras de pressão.

Tantos nas feridas como nas úlceras de pressão, os MSSA, mostraram 100% de resistência à penicilina e total sensibilidade à vancomicina, teicoplanina e oxacilina. Nos restantes antibióticos a resistência é idêntica para ambas as mostras.

Tabela 11: Perfil de resistência dos MRSA e MSSA nas feridas operatórias e úlceras de pressão.

	MRSA (n=42) (%)		MSSA (n=28) (%)	
	<i>Feridas operatórias (n=22)</i>	<i>Úlceras de pressão (n=20)</i>	<i>Feridas operatórias (n=13)</i>	<i>Úlceras de pressão (n=15)</i>
PEN	100,0	95,0	100,0	100,0
TSU	40,9	55,0	23,1	33,3
GEN	18,2	60,0	15,4	13,0
ERY	86,4	100,0	46,2	60,0
CLI	45,5	75,0	23,1	13,0
TET	27,3	65,0	15,4	26,7
VAN	0	0	0	0
TEC	13,6	30,0	0	0
LVX	68,2	60,0	15,4	33,3
OXA	100,0	100,0	0	0

Na tabela 12 pode ver-se o perfil de resistência da *P. aeruginosa*, tanto nas feridas operatórias como nas úlceras de pressão.

Em ambas as amostras observou-se 100% de resistência ao cotrimoxazol e à amoxicilina e uma elevada resistência à amoxicilina + ac. clavulânico.

Nas feridas operatórias verificou-se total sensibilidade ao imipeneme e à ceftazidima e também uma elevada sensibilidade a estes antibióticos nas úlceras de pressão.

Em geral verificou-se que nas úlceras de pressão, as *Pseudomonas aeruginosa* isoladas demonstraram ter maior resistência aos antibióticos do que na feridas operatórias.

Tabela 12: Perfil de resistência da *P. aeruginosa* nas feridas operatórias e úlceras de pressão.

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=16) %	
	<i>Feridas operatórias (n=4)</i>	<i>Úlceras de pressão (n=12)</i>
TSU	100,0	100,0
PIP	25,0	66,7
TZP	25,0	41,7
IMI	0	8,3
GEN	25,0	50,0
CIP	50,0	75,0
AMX	100,0	100,0
AMC	100,0	91,7
CAZ	0	25,0
FEP	50,0	58,3

O perfil de resistência de *Proteus mirabilis* isolado de feridas operatórias, demonstrou total resistência a dois antibióticos, amoxicilina e cotrimoxazol e 100% sensibilidade aos restantes antibióticos. Nas úlceras de pressão verificou-se total sensibilidade à ceftazidima, elevada sensibilidade à piperacilina + tazobactam, cefoxitina, cefepima e ao imipeneme e elevada resistência aos restantes antibióticos (Tabela 13).

Tabela 13: Perfil de resistência do *Proteus mirabilis* nas feridas operatórias e úlceras de pressão.

	<i>Proteus mirabilis</i> (n=11) %	
	<i>Feridas operatórias</i> (n=3)	<i>Úlceras de pressão</i> (n=8)
AMX	100,0	62,5
AMC	0	62,5
PIP	0	62,5
TZP	0	12,5
CEF	0	50,0
FOX	0	12,5
CAZ	0	0
FEP	0	12,5
IMI	0	12,5
TSU	100,0	62,5
GEN	0	50,0
CIP	0	87,5

As *E. coli* isoladas das úlceras de pressão apresentaram mais resistências aos antibióticos que as isoladas de feridas operatórias. Nas feridas operatórias observou-se resistência à amoxicilina, piperacilina, cefalotina, cotrimoxazol e uma pequena percentagem à ciprofloxacina. Nas úlceras de pressão, as *E. coli* isoladas, apresentaram apenas sensibilidade à piperacilina + tazobactam e resistência aos restantes antibióticos, destacando-se a resistência à amoxicilina, piperacilina, cefalotina e ciprofloxacina (Tabela 14).

Tabela 14: Perfil de resistência da *E. coli* nas feridas operatórias e úlceras de pressão.

	<i>Escherichia coli</i> (n=9) %	
	<i>Feridas operatórias</i> (n=6)	<i>Úlceras de pressão</i> (n=3)
AMX	83,0	100,0
AMC	0	33,3
PIP	67,0	100,0
TZP	0	0
CEF	50,0	100,0
FOX	0	33,3
CAZ	0	33,3
FEP	0	33,3
IMI	0	33,3
TSU	33,0	33,3
GEN	0	33,3
CIP	17,0	100,0

4.1.4 Bactérias multi-resistentes isoladas de Janeiro a Março de 2010

De Janeiro a Março de 2010 isolou-se de exsudatos (feridas operatórias e úlceras de pressão), 10 microrganismos multi-resistentes, de um total de 29 microrganismos (Tabela 15).

Tabela 15: Resumo dos dados referentes às amostras colhidas no período de Janeiro a Março de 2010.

Exsudatos (n=22)						
	<i>n</i>	<i>Internam ento (n)</i>	<i>Consulta Externa (n)</i>	<i>Exame cultural positivo (n)</i>	<i>Exame cultural negativo (n)</i>	<i>Microrganismos isolados (n)</i>
Úlceras de pressão	13	3	10	10	3	22
Feridas operatórias	9	0	9	6	3	7

Dos 10 microrganismos isolados, metade foram MRSA (Figura 17). Considerou-se que os microrganismos eram multi-resistentes, quando apresentavam resistência a 3 famílias de antibióticos.

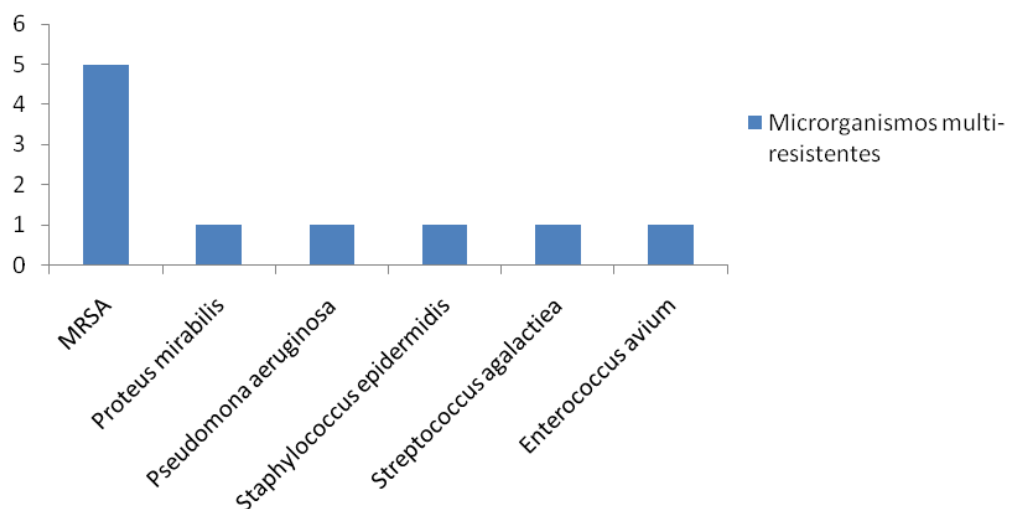


Figura 17: Número de microrganismos multi-resistentes isolados de exsudatos no período de Janeiro a Março de 2010.

Nas tabelas 16, 17, 18, 19, estão representados os antibiogramas das bactérias multi-resistentes isoladas das úlceras de pressão e feridas operatórias, no período de Janeiro a Março de 2010. O resultado foi dado como S - sensível, R - resistente ou I - Intermédio.

Tabela 16: Antibiograma de *Staphylococcus spp.*

	PEN	TSU	GEN	ERY	CLI	TET	MIN	VAN	TEC	RIF	NOR	LVX	FUC	NIT	Q/D	OXAE	OXA
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	S	R	I	S	S	S	S	I	R	R	S	S	S	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	I	I	R	I	S	S	S	R	R	R	I	I	S	R	R
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	R	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	R

Tabela 17: Antibiograma de *Pseudomona aeruginosa*

	SAM	TIC	TIC-pyo	TIM	TIM-pyo	PIP	PIP-pyo	TZP	TZP-pse	FEP	IMI	MEM	CAZ	AMK	GEN	TOB	CIP	CST	TSU
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R

Tabela 18: Antibiograma de *Streptococcus agalatae* e *Enterococcus avium*

	PEN 0,031- 0,5 (mg/l)	PEN 0,063- 1(mg/l)	PEN 0,125- 2(mg/l)	PEN 0,25- 4(mg/l)	PEN 0,12- 2(mg/l)	AMX	CTX 0,5- 2(mg/l)	CTX 1- 4(mg/l)	CTX 0,5- 1(mg/l)	ERY	Q/D	CLI	TET	LVX	CMP	VAN	TSU
<i>Streptococcus agalatae</i>	I	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R
<i>Enterococcus avium</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S

Tabela 19: Antibiograma de *Proteus mirabilis*

	AMX	AMC	PIP	TZP	TET	TIM	CEF	FOX	CTX	CAZ	FEP	CXM	MEM	IMI	CAZ 1	TSU	TOB	AMK	GEN	NET	CIP
<i>Proteus mirabilis</i>	R	S	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	S

4.2 Detecção e Pesquisa de β -lactamases

4.2.1 Electroforese em gel de agarose - DNA *Proteus spp*

A primeira parte do trabalho consistiu em extrair DNA genómico das células do *Proteus spp*. Para se confirmar o sucesso da extracção efectuou-se uma electroforese em gel de agarose.

Tal como é possível ver na figura 18, foi realizada com êxito porque na electroforese é possível ver duas bandas que correspondem a duas amostras de DNA *Proteus spp*.



Figura 18: Electroforese de DNA genómico das células de *Proteus spp*. **M:** Marcador GeneRuler™ 1 k Plus DNA Ladder (Fermentas); **1 e 2:** DNA *Proteus spp*.

4.2.2 Electroforese em gel de agarose - 16S rDNA

Efectuou-se a amplificação do gene 16S rDNA da bactéria em estudo, pela técnica de PCR, com o objectivo de sequenciação e confirmação da presença do *Proteus spp.* Através da electroforese em gel de agarose, pode-se confirmar a presença do gene 16S rDNA, pois é visível uma banda de 1505pb, tal como evidencia a figura 19. De acordo com o artigo Henriques IS *et al* 2006 o gene 16S rDNA, tem um tamanho de 1505 pb.

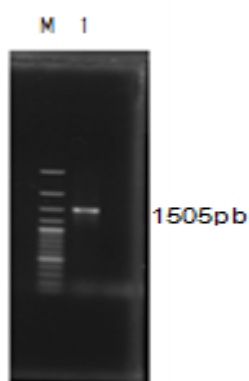


Figura 19: Electroforese dos produtos resultantes da amplificação do gene 16S rDNA do *Proteus spp.* **M:** Marcador: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) **1:** gene 16S rDNA.

4.2.3 Sequenciação

Na sequenciação o *primer* usado foi o 27F.

Para visualizar a sequência utilizou-se a base de dados *GENBANK* e o *Software Blast*.

4.2.4 Electroforese em gel de agarose - genes β -lactamases TEM, SHV e CTX-M

Nesta etapa do trabalho pretendíamos verificar se a bactéria em estudo, *Proteus spp.*, possuía os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}, com o objectivo de confirmar a sua resistência aos β -lactâmicos.

Para isso amplificou-se cada um dos fragmentos de DNA, pela técnica de PCR, e efectuou-se uma electroforese, cujo resultado está demonstrado na figura 20. Através da leitura da

electroforese pode observar-se, para além do marcador, três bandas de tamanhos diferentes, que correspondem ao controlo positivo de cada um dos genes. Para além disso, não se visualiza mais nenhuma banda, não sendo possível visualizar os genes, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}.

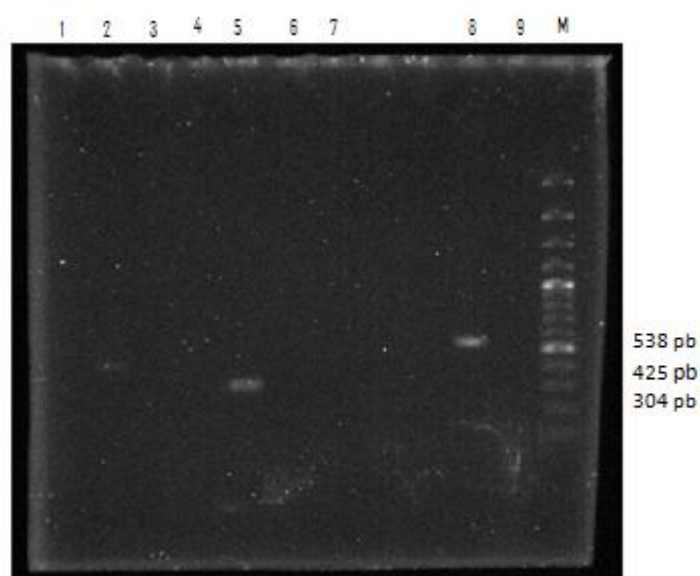


Figura 20: Electroforese dos produtos resultantes da amplificação dos genes de β -lactamases. **M:** Marcador: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas); **1:** gene *bla*_{TEM}; **2:** TEM+; **3:** TEM-; **4:** gene *bla*_{SHV}; **5:** SHV+; **6:** SHV- **7:** gene *bla*_{CTX-M}; **8:** CTX+; **9:** CTX-.

5 Discussão

Neste trabalho realizou-se um estudo retrospectivo dos anos 2008 e 2009, sobre o perfil de resistência antimicrobiana em feridas operatórias e úlceras de pressão e comparou-se com outro estudo realizado, entre 1998 e 2002, na mesma unidade hospitalar.

Este tipo de comparações são bastante úteis pois dão uma percepção sobre a evolução dos microrganismos isolados e do seu perfil antimicrobiano, ao longo dos anos.

Neste trabalho analisaram-se 124 exsudatos dos quais resultaram 173 microrganismos.

No tratamento dos dados não se teve em conta a origem das amostras, ou seja se eram provenientes do internamento ou da consulta externa. Nos doentes com feridas operatórias é difícil saber se as infecções são de origem hospitalar, uma vez que o tempo de internamento (no pós operatório) é curto e os doentes após a alta ou são seguidos na consulta externa do HVS ou em Unidades de Saúde da sua área de residência. No caso de amostras provenientes de doentes com úlceras de pressão, não se pode verificar se estas infecções eram de origem nosocomial, uma vez que não estava disponível a informação se o doente já trazia infecção aquando do seu internamento.

Nas úlceras de pressão e nas feridas operatórias obteve-se uma grande percentagem de exames culturais positivos, 92,7% e 79,7% respectivamente. Isto é justificado pelo facto de as amostras só serem encaminhadas para laboratório quando o médico detecta sinais prováveis de infecção. Nas amostras em que os exames culturais foram negativos, a maior parte dos doentes já se encontravam sujeitos a antibioterapia empírica.

Neste estudo os principais microrganismos isolados, tanto nas feridas operatórias como nas úlceras de pressão, foram *S. aureus*, com maior percentagem de MRSA (26,8% nas feridas operatórias e 22,0% nas úlceras de pressão). Para além destes, há a destacar, nas úlceras de pressão uma significativa percentagem de *P. aeruginosa* (13,2%) e de *Proteus mirabilis* (8,8%) e nas feridas operatórias uma expressiva percentagem de *E. coli* (7,3%).

Nas feridas operatórias o tipo de microrganismos responsáveis pela infecção, depende normalmente do local onde está localizada a ferida. Nas úlceras de pressão o mais comum, no início da infecção, são *S. aureus* por fazerem parte da flora comensal da pele do homem e por se encontrarem no vestuário e nas roupas de cama (Brooks GF *et al* 2005).

Embora não se saiba com clareza a origem da infecção, ou seja se é nosocomial ou da comunidade, através da literatura e dos artigos científicos publicados, sabe-se que o *S. aureus* e a *P. aeruginosa* são os microrganismos mais isolados a nível hospitalar (Brooks GF *et al* 2005; Vitkauskienė A *et al* 2010).

Comparando o nosso estudo com o realizado entre 1998 e 2002 (Tabela 20), verifica-se, que em geral, continuam-se a isolar em primeiro lugar os *S. aureus* e em segundo, nas úlceras de pressão a *P. aeruginosa* e o *Proteus mirabilis*. Embora tivesse havido uma oscilação na

percentagem de isolados, traduzida no aumento de *S. aureus* e na diminuição de *P. aeruginosa* e do *Proteus mirabilis*.

Esta variação na percentagem de isolados nos dois estudos, pode ser eventualmente justificada pelo facto de no nosso estudo o número de amostras ser baixo, o período em análise ser de dois anos e não ser contíguo ao estudo anterior.

O resultado obtido nestes dois estudos vem ao encontro do que se tem vindo a publicar em diversos artigos científicos. Os microrganismos mais isolados em feridas crónicas são *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Kirketerp-Møller K *et al* 2008).

Tabela 20: Resumo dos microrganismos mais isolados entre 1998 e 2002 e nos anos 2008 e 2009.

	Estudo 1998 a 2002 (\pm %)		Estudo 2008 e 2009 (%)	
	(exsudatos n=300)		(exsudatos n=124)	
	Feridas operatórias	Úlceras de pressão	Feridas operatórias	Úlceras de pressão
<i>S. aureus</i>	36	23	42,7	38,5
<i>P. aeruginosa</i>	17	20	4,9	13,2
<i>Proteus mirabilis</i>	10	20	3,7	8,8
<i>E. coli</i>	5	7	7,3	3,3

Neste estudo avaliou-se o perfil de resistência de *S. aureus* dividindo-os em MRSA e MSSA. Não foi possível a comparação com o estudo anterior, pois esta análise não foi realizada distintamente.

Em ambas as amostras verificou-se, que todos os MRSA eram resistentes à oxacilina, e todos os MSSA eram sensíveis.

A oxacilina pertence ao grupo das penicilinas, da qual também faz parte a meticilina, daí ser comum a resistência dos MRSA também a este antibiótico (Mota-Meira M *et al* 2000).

Verificou-se que todos os *S. aureus* eram sensíveis à vancomicina e teicoplanina e quase todos resistentes à penicilina, resultado que também se obteve no estudo de 1998 a 2002. Este tipo de perfil antimicrobiano é característico dos *S. aureus* (Al-Talib HI *et al* 2010).

Em ambas as amostras, a maior parte dos MSSA apresentaram mais sensibilidade antimicrobiana que os MRSA, destacando-se elevada sensibilidade à levofloxacina, tetracilina, clindamicina e gentamicina. Nos MRSA obteve-se elevada resistência à eritromicina.

A maioria dos MRSA e MSSA apresentaram maior resistência antimicrobiana nas úlceras de pressão do que nas feridas operatórias.

No perfil antimicrobiano das *P. aeruginosa* observou-se, em ambas as amostras, 100% de resistência ao cotrimoxazol e à amoxicilina e uma elevada resistência à amoxicilina + ac. clavulânico.

Nas feridas operatórias verificou-se total sensibilidade ao imipeneme e à ceftazidima e também uma elevada sensibilidade a estes antibióticos nas úlceras de pressão. O mesmo se verificou no trabalho anterior (IMI 60% feridas operatórias e 75% úlceras de pressão; CAZ 60% feridas operatórias e 52% úlceras de pressão), podem ser por isso indicados como antibióticos de primeira linha na antibioterapia empírica.

Nas feridas operatórias verifica-se também sensibilidade à piperacilina, piperacilina + tazobactam e gentamicina, podendo por isso serem considerados antibióticos de segunda linha. A gentamicina pode ser usada como alternativa no caso dos doentes alérgicos aos β -lactâmicos. Nas úlceras de pressão a piperacilina + tazobactam pode ser utilizada em alternativa aos antibióticos de primeira linha, contudo no trabalho anterior não se verificou o mesmo resultado.

Na globalidade verificou-se que nas úlceras de pressão, as *P. aeruginosa* isoladas, demonstraram ter maior resistência aos antibióticos do que nas feridas operatórias e o mesmo se apurou no trabalho anterior.

O perfil de resistência do *Proteus mirabilis* é de valorizar nas úlceras de pressão, já que foi o terceiro microrganismo mais isolado (8,8%). Nas feridas operatórias a percentagem foi bastante reduzida, podendo deturpar o perfil antimicrobiano desta bactéria.

Comparando os dois estudos (Tabela 21), pode-se afirmar que em ambos, uma infecção provocada por um *Proteus mirabilis* revelou uma elevada resistência aos seguintes antibióticos: amoxicilina, amoxicilina+ac. clavulânico, cefalotina, cotrimoxazol e ciprofloxacina. A ceftazidima foi o antibiótico com maior sensibilidade demonstrada para esta bactéria.

No estudo entre 1998 e 2002 verificou-se uma maior resistência a todos os antimicrobianos testados, conforme se pode analisar na tabela discriminatória que se segue.

Tabela 21: Perfil de resistência de *Proteus mirabilis*, nas úlceras de pressão nos estudos entre 1998 e 2002 e nos anos 2008 e 2009.

<i>Proteus mirabilis</i> (Úlceras de pressão)		
	Estudo entre 1998 e 2002 (\pm %)	Estudo 2008 e 2009 (%)
AMX	93,0	62,5
AMC	93,0	62,5
PIP	-	62,5
TZP	60,0	12,5
CEF	90,0	50,0
FOX	89,0	12,5
CAZ	40,0	0
FEP	40,0	12,5
IMI	29,0	12,5
TSU	90,0	62,5
GEN	71,0	50,0
CIP	68,0	87,5

Em relação ao perfil de resistência de *E. coli*, nos diferentes estudos, não se verificaram grandes discrepâncias nos resultados. Obteve-se elevada resistência à amoxicilina e à cefalotina, sendo os restantes antibióticos bastante sensíveis (Tabela 22).

A baixa resistência desta bactéria poderá ser uma indicação de que se trata de um microrganismo com origem na comunidade.

Tabela 22: Perfil de resistência de *E.coli*, nas úlceras de pressão nos estudos entre 1998 e 2002 e nos anos 2008 e 2009.

<i>Escherichia coli</i> (Feridas operatórias)		
	<i>Estudo entre 1998 e 2002</i> (\pm %)	<i>Estudo 2008 e 2009</i> (%)
AMX	60,0	83,0
AMC	20,0	0
PIP	-	67,0
TZP	10,0	0
CEF	60,0	50,0
FOX	10,0	0
CAZ	10,0	0
FEP	10,0	0
IMI	20,0	0
TSU	50,0	33,0
GEN	30,00	0
CIP	30,00	17,00

No período de Janeiro a Março de 2010 isolaram-se 10 microrganismos multi-resistentes de amostras de exsudatos e destes 5 eram MRSA.

Apesar do período de tempo ser muito curto e do número de amostras ser reduzida (n=22), o número de MRSA multi-resistentes isolados vai de encontro ao resultado obtido noutros estudos. Como é o caso do estudo publicado do Boletim da Comissão de Controlo de Infecção, de Abril a Junho 2007.

Neste trabalho optou-se pelo estudo de *Proteus* multi-resistente isolado, pois era um bacilo Gram negativo resistente aos β -lactâmicos.

Efectuou-se a amplificação do gene 16S rDNA e o resultado da sequenciação confirmou a presença de *Proteus spp* com uma percentagem de 99% à espécie *Proteus mirabilis*.

As ESBL em *Enterobacteriaceae*, são reconhecidas mundialmente como um grande problema hospitalar, porque as estirpes produtoras de ESBL e os seus genes codificadores, podem ficar permanentemente no meio hospitalar e causar surtos preocupantes (Dropa M *et al* 2009).

O problema da resistência aos antibióticos, tais como as ESBL, pode variar muito dependendo da população de doentes, da época, região demográfica e ainda da colheita e análise das estirpes.

Segundo um estudo publicado no artigo Ho PL *et al* 2005, na Europa 15,2% de 688 *Proteus mirabilis* isolados, durante 1997 e 2001, de 40 hospitais locais eram produtores de ESBL. Isto pode ser corroborado com outro estudo apresentado no mesmo artigo, que decorreu entre 1996 e 1999, em que 171 *Proteus mirabilis* analisados em 53 laboratórios hospitalares dos Estados Unidos, 3,5% também eram produtores de ESBL.

A resistência aos β -lactâmicos, no *Proteus mirabilis* faz-se muitas vezes pela presença das β -lactamases, TEM, SHV e CTX-M (Ho PL *et al* 2005).

Neste trabalho avaliou-se a resistência de um *Proteus mirabilis* aos β -lactâmicos, através da pesquisa dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}.

Segundo a análise fenotípica efectuada através do antibiograma, o *Proteus mirabilis* era resistente às penicilinas (amoxicilina, piperacilina, ticarcilina) e cefalosporinas (cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, cefepime e cefuroxima), apresentava sensibilidade intermédia aos β -lactâmicos +inibidores, excepto à amoxicilina + ac. clavulânico, que era totalmente sensível e ainda sensibilidade aos carbapenemos.

Através da electroforese efectuada aos produtos resultantes da amplificação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}, não se verificou a presença de nenhum destes genes.

Pode-se assim afirmar que a resistência aos β -lactâmicos, nesta bactéria, não tem origem nas β -lactamases TEM, SHV e CTX-M, podendo contudo estar associada à presença de outras β -lactamases.

É comum no género *Proteus* e em outras *Enterobacteriaceae* a existência das enzimas Ampc. Estas enzimas são cefalosporinases que promovem resistência a algumas cefalosporinas, à maioria das penicilinas e aos β -lactâmicos+inibidores. O gene *bla*_{Ampc} inicialmente codificado no cromossoma das bactérias sofreu uma transferência para os plasmídeos das bactérias (Rawat D, and Nair D 2010).

A resistência aos β -lactâmicos não passa só pela presença de β -lactamases nas bactérias. Estes são apenas uma parte de uma grande panóplia de mecanismos celulares que os procariontes desenvolveram para evitar a acção dos β -lactâmicos. Assim, a sua acção pode também ser ineficaz por alteração do alvo de actuação (as PBPs), impermeabilização da membrana externa e bombas de efluxo;

Seriam necessários diversos testes de confirmação fenotípica e genotípica para se verificar se este *Proteus* produz ESBL. De acordo com o artigo de Rawat D. e Nair D. alguns dos métodos de detecção de ESBL que se poderiam utilizar seriam: o teste de dupla difusão ou o teste de aproximação de disco, também denominado de **Double Disc Synergy Test (DDST)**. O teste é

considerado positivo sempre que se detectam fenómenos de sinergismo, isto é, quando se observa um aumento no(s) halo(s) de inibição em redor do(s) discos(s) de cefalosporinas de espectro alargado e/ou aztreonam ou ainda o aparecimento de uma terceira zona de inibição designada por *ghost zone*; **teste de adição de ácido clavulânico**. Este método consiste em adicionar um inibidor de β -lactamases, o ácido clavulânico, a antibióticos β -lactâmicos de espectro alargado (como a cefuroxima, a ceftazidima, a cefotaxima, a ceftriaxona) e ao aztreonam; **métodos automatizados**. Encontram-se comercializados vários sistemas automáticos para a caracterização fenotípica de *Enterobacteriaceae*. São exemplo, os sistemas BD Phoenix, e ViteK System.

6 Conclusão

* Apenas com os dados disponíveis não é possível definir se a origem das infecções, nas úlceras de pressão e feridas operatórias, se encontra a nível hospitalar ou na comunidade;

Seriam necessários estudos extensivos de genotipagem de isolados hospitalares e da comunidade poderiam contribuir para esclarecer a questão anterior;

* Os microrganismos mais isolados nos dois estudos, em ambas as amostras, foram os *S. aureus*. Neste estudo houve mais prevalência de MRSA do que MSSA. Isto apoia a evidência de que cada vez mais os *S. aureus* desenvolvem resistência à meticilina;

* Nas úlceras de pressão, em ambos os estudos, os microrganismos mais isolados, a seguir aos *S. aureus*, foram as *P.aeruginosa* e o *Proteus mirabilis*; Nas feridas operatórias, depois dos *S. aureus*, não se verificou concordância no microrganismo mais isolado;

* A elevada percentagem de *S. aureus* e *P. aeruginosa* isolados nos dois estudos é coincidente com o publicado nos artigos científicos, que relatam que estes são os microrganismos mais isolados nas feridas crónicas;

* Verificou-se, nos dois estudos, que *S. aureus* eram sensíveis à vancomicina e teicoplanina e a maior parte resistentes à penicilina. Este facto demonstra que *S. aureus* isolados nesta unidade hospitalar não desenvolveram novas resistências a estes dois antibióticos, ao contrário do que já se tem vindo a publicar em diversos artigos científicos;

* Em ambos os estudos verificou-se que: *P. aeruginosa* apresentou elevada resistência ao cotrimoxazol, à amoxicilina e à amoxicilina + ac. clavulânico e elevada sensibilidade ao imipeneme e à ceftazidima; *Proteus mirabilis* manifestou elevada resistência à amoxacilina, amoxicilina+ac.clavulânico, cefalotina, cotrimoxazol e ciprofloxacina e alta sensibilidade à ceftazidima; *E. coli* foi bastante resistente à amoxacilina e cefalotina e revelou alta sensibilidade aos restantes antibióticos;

* Verificou-se que *S. aureus* e *P. aeruginosa* isolados das úlceras de pressão ofereciam maior resistência antimicrobiana que os isolados das feridas operatórias. Embora não se soubesse a origem das amostras, pode-se concluir, que devido à elevada resistência que estas bactérias revelaram, são provavelmente de origem nosocomial;

* Este trabalho associado ao realizado entre 1998 e 2002 dão um importante contributo para definir o perfil de resistência dos microrganismos mais isolados, facultando aos clínicos uma importante ferramenta de apoio no tratamento empírico. Um tratamento adequado é útil não só para o doente como para minimizar o aparecimento e disseminação de resistências bacterianas;

* Da pesquisa de β -lactamases na estirpe de *Proteus mirabilis* isolada no presente estudo, conclui-se que a resistência aos β -lactâmicos não se deve à presença das β -lactamases TEM, SHV e CTX-M. Seriam necessários mais pesquisas laboratoriais para confirmar se este *Proteus spp* produz ESBL.

7 Perspectivas futuras

Em termos de perspectivas futuras seria útil, a realização de estudos prospectivos que permitissem conhecer a origem das infecções nas feridas operatórias e úlceras de pressão, pois possibilitariam conhecer com mais certeza a origem dos microrganismos isolados e ajudariam a conhecer melhor os perfis de resistência tanto a nível hospitalar como na comunidade.

Como poderia saber se são de origem hospital ou da comunidade? Uma possibilidade seria isolar estirpes das 3 espécies dominantes nas feridas (*S aureus*, *P aeruginosa* e *Proteus mirabilis*) em vários pontos do hospital como por exemplo, nas salas de espera ou nos locais onde os funcionários deixam os seus pertences e trocam de indumentária. Depois, tipar geneticamente essas estirpes, determinar resistências a antibióticos e comparar padrões entre os vários locais.

Por outro lado seria interessante explorar os restantes mecanismos de resistência às β -lactamases no *Proteus mirabilis*, nomeadamente o gene *bla*_{AmpC}, de modo a contribuir para o conhecimento das resistências neste género de bactérias.

8 Bibliografia

- * Al-Talib HI, Yean CY, Al-Jashamy K, Hasan H. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infection trends in Hospital Universiti Sains Malaysia during 2002-2007. *Ann Saudi Med* 30(5):358-363.
- * Brooks GF, Butel JS, Morse SA. 2005. *Microbiologia Médica*. Copyright 22ª Edição.
- * Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54(3):969-976.
- * Caldeira L, Teixeira I, Vieira I, *et al.* 2006. Monitorização do Consumo de Antibióticos, Nos serviços de Cirurgia e de Ortopedia de Seis Hospitais SA. *Acta Med Port* 19:55-66.
- * Campos LS. 2002. *Entender a Bioquímica*. Escolar Editora. 3ª edição. p. 51.
- * Carattoli A. 2009. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 53(6):2227-2238.
- * Carlson P, Rautio M, Renkonen R, *et al.* 2008. Connection between trimethoprim-sulfamethoxazole use and resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 52(7):2480-2485.
- * Cunha JGS. 1999. Resistência aos antibióticos em pneumologia. *Revista Portuguesa de Pneumologia* 5(1):28-34.
- * Di Conza JA, Gutkind GO. 2010. Integrones: los coleccionistas de genes. *Rev Argent Microbiol* 42(1):63-78.
- * Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, *et al.* 2009. Extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae isolated in a public hospital in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51(4):203-209.
- * Gist S, Tio-Matos I, Falzgraf S, Cameron S, Beebe M. 2009. Wound care in the geriatric client. *Clin Interv Aging* 4:269-287.
- * Hachenberg T, Sentürk M, Jannasch O, Lippert H. 2010. Postoperative wound infections. Pathophysiology, risk factors and preventive concepts. *Der Anaesthesist* 59(9):851-868.

- * Henriques IS, Fonseca F, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. 2006. Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res Microbiol* 157(10):938-947.
- * Ho PL, Ho AY, Chow KH, Wong RC, Duan RS, Ho WL, Mak GC, Tsang KW, Yam WC, Yuen KY. 2005. Occurrence and molecular analysis of extended-spectrum β -lactamase-producing *Proteus mirabilis* in Hong Kong, 1999-2002. *J Antimicrob Chemother* 55(6):840-845.
- * Jacoby GA. 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22(1):161-182.
- * Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, Fazli M, Madsen KG, Pedersen J, Moser C, Tolker-Nielsen T, Høiby N, Givskov M, Bjarnsholt T. 2008. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 46(8):2717-2722.
- * Koneman EW, Allen SD, *et al.* Diagnostic Microbiology. Lippincott. p. 458-461.
- * Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. 2000. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 44(12):3249-3256.
- * Kusumoto S, Fukase K, Shiba T. 2010. Key structures of bacterial peptidoglycan and lipopolysaccharide triggering the innate immune system of higher animals: chemical synthesis and functional studies. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86(4):322-337.
- * Labetoulle M, Chiquet C. 2008. Fluoroquinolones in ophthalmology: mechanisms of action and resistance. *J Fr Ophtalmol* 31(8):795-801.
- * Lamson DW, Sadlon AE. 2010. A case of MRSA controlled: predisposing factors and immune stimulation. *Altern Med Rev* 15(2):147-151.
- * Leinberger DM, Grimm V, Rubtsova M, Weile J, Schröppel K, Wichelhaus TA, Knabbe C, Schmid RD, Bachmann TT. 2010. Integrated detection of extended-spectrum-beta-lactam resistance by DNA microarray-based genotyping of TEM, SHV, and CTX-M genes. *J Clin Microbiol* 48(2):460-471.
- * Lito LM, Pereira ASA, Aldeia FJR, Bento HC, Correia MMJ, Carvoeiro MN, Amores T, Sabbo MJ, Lourenço RM, Ávila A. Comissão de Controlo de Infecção Hospitalar (CCIH). Hospital Santa Maria. Boletim Trimestral Abril-Junho 2007.

- * Luzzaro F. 2008. Fluoroquinolones and Gram-negative bacteria: antimicrobial activity and mechanisms of resistance. *Infez Med* 16(12):5-11.
- * Martinez JL. 2009. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 276(1667):2521-2530.
- *Masters PA, O'Bryan TA, Zurlo J, Miller DQ, Joshi N. 2003. Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. *Arch Intern Med* 163(4):402-410.
- *Millar BC, Xu J, Moore JE. 2007. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. *Curr Issues Mol Biol* 9(1):21-39.
- * Morello JA, Granato PA, Mizer HE. 2002. Laboratory Manual and workbook in Microbiology, Applications to Patient Care. 7th Edition, Spiral Bound/Comb. p.89-95.
- * Mota-Meira M, LaPointe G, Lacroix C, Lavoie MC. 2000. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (1):24-29.
- * Nicolas-Chanoine MH. 1997. Inhibitor-resistant beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 40(1):1-3.
- * Nikaido H. 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem* 78:119-146.
- * Norman A, Hansen LH, Sørensen SJ. 2009. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 4(1527):2275-2289.
- * Patel MH, Trivedi GR, Patel SM, Vegad MM. 2010. Antibiotic susceptibility pattern in urinary isolates of gram negative bacilli with special reference to AmpC β -lactamase in a tertiary care hospital. *Urol Ann* 2(1):7-11.
- * Poole K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 56(1):20-51.
- * Rawat D, Nair D. 2010. Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis* 2(3):263-274.
- * Rodrigues F, Bertoldi AD. 2010. The profile of antimicrobial utilization in a private hospital. *Cien Saude Colet* 15(1):1239-1247.
- * Różalski A, Sidorczyk Z, Kotelko K. 1997. Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol Mol Biol Rev* 61(1):65-89.

- * Sekowska A, Janicka G, Wróblewska J, Kruszyńska E. 2004. Prevalence of *Proteus mirabilis* strains in clinical specimens and evaluation of their resistance to selected antibiotics. *Pol Merkuriusz Lekarski* 17(101):538-540.
- * Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(5)
- * Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev* 19(3):512-530.
- * Sousa JC. 2006. Manual de Antibióticos Antibacterianos. Fundação Fernando Pessoa 2ª edição Porto. p. 47-413.
- * Van H J. 2001. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* 11(3):25R-36R.
- * Vitkauskienė A, Skrodenienė E, Dambrauskienė A, Macas A, Sakalauskas R. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality. *Medicina (Kaunas)* 46(7):490-495.
- * Wolfson JS, Hooper DC. 1984. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 28(4):581-586.
- * <http://users.med.up.pt> [acedido em 9 de Setembro de 2010]
- * <http://faculty.irsc.edu> [acedido em 22 de Outubro de 2010]
- * <http://jac.oxfordjournals.org/content/51/1/9.full> [acedido em 30 de Outubro de 2010]
- * <http://www.bacterio.cict.fr/p/proteus.html> [acedido em 16 de Novembro de 2010]

9 Anexo

Preparação do meio LB

1. Medir o volume necessário de água desionizada para um balão Erlenmeyer;
2. Pesar o extracto de levedura, a triptona e o cloreto de sódio;
3. Adicionar ao balão e agitar até dissolver;
4. Adicionar o agar e agitar até homogeneizar;
5. Perfazer o volume final desejado, adicionando água e agitar;
6. Esterilizar o meio de cultura no autoclave a 121 °C durante 20 minutos à pressão de 1atm.
7. Deixar arrefecer o meio de cultura até aos 50°C, de preferência em banho-maria;
8. Transferir o meio (15 a 20 ml) do balão de Erlenmeyer para caixas de petri;
9. Agitar suavemente a caixa para assegurar que o meio fica uniformemente distribuído;
10. Deixar o meio solidificar na placa;
11. Guardar a placa em posição invertida.

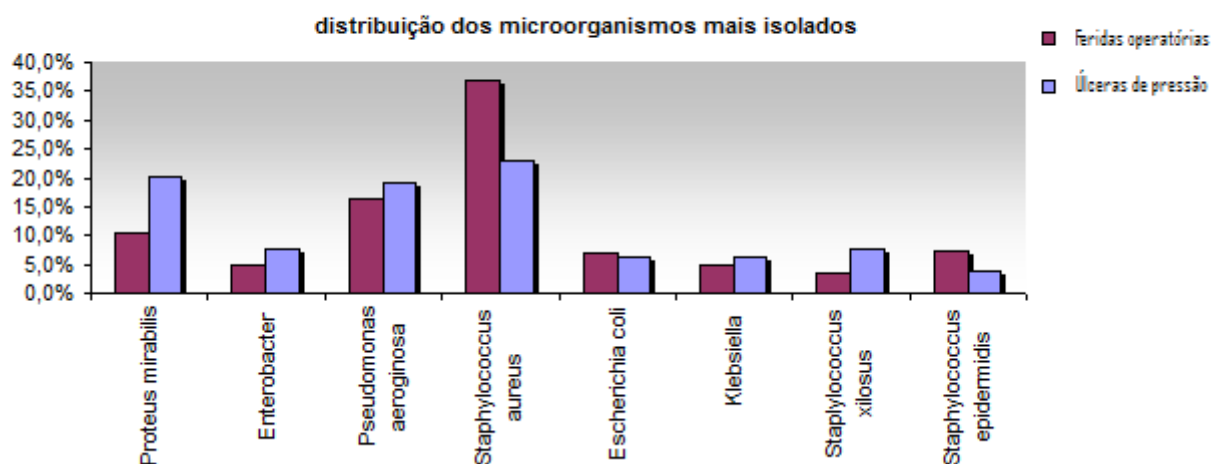


Figura 21: Microorganismos mais isolados do estudo realizado no HVS, entre 1998 e 2002.

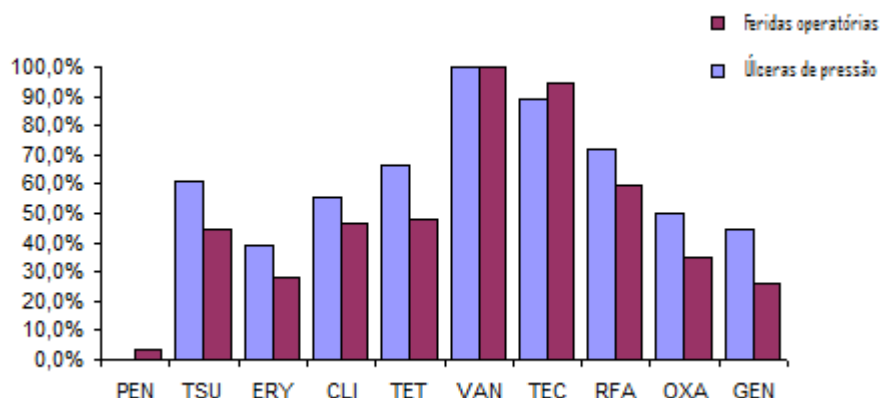


Figura 22: Perfil de sensibilidade dos *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos, estudo realizado no HVS, entre 1998 e 2002.

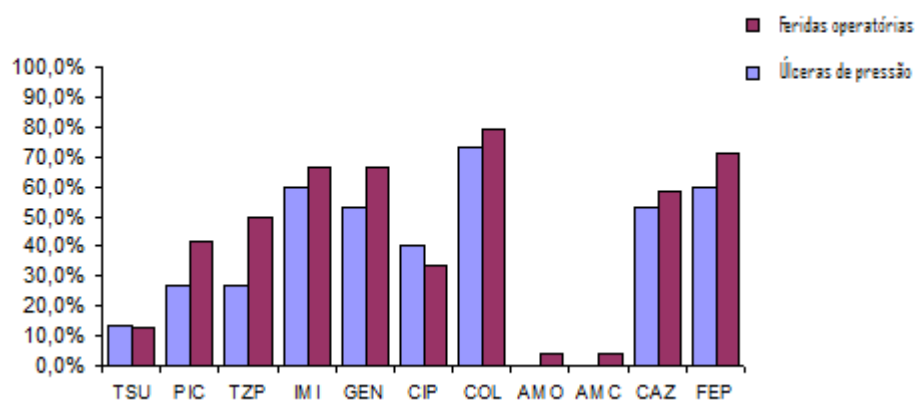


Figura 23: Perfil de sensibilidade dos *Pseudomona aeruginosa* aos antimicrobianos, estudo realizado no HVS, entre 1998 e 2002.

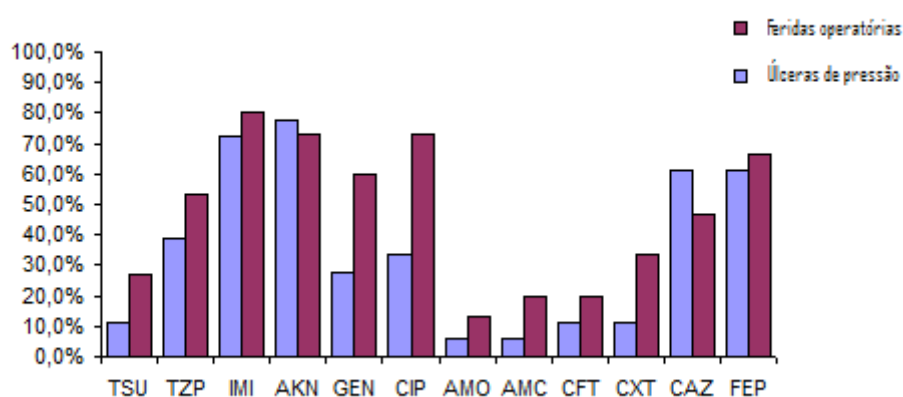


Figura 24: Perfil de sensibilidade dos *Proteus mirabilis* aos antimicrobianos, estudo realizado no HVS, entre 1998 e 2002.

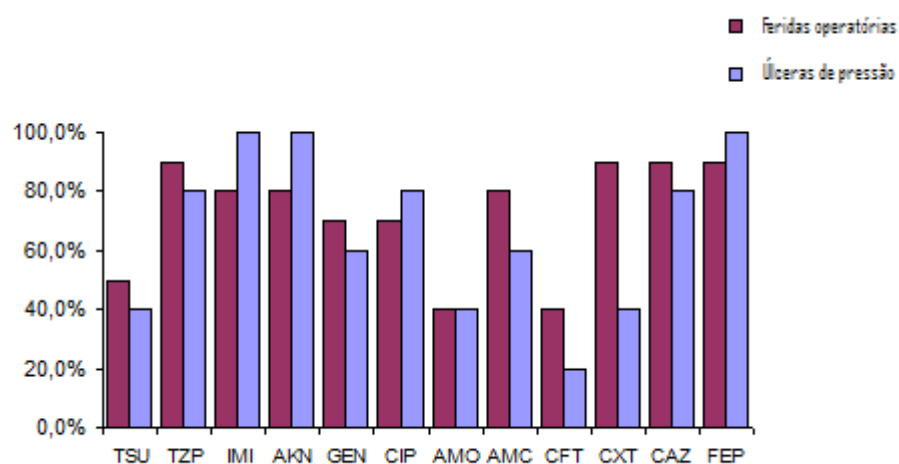


Figura 25: Perfil de sensibilidade dos *Escherichia coli* aos antimicrobianos, estudo realizado no HVS, entre 1998 e 2002.

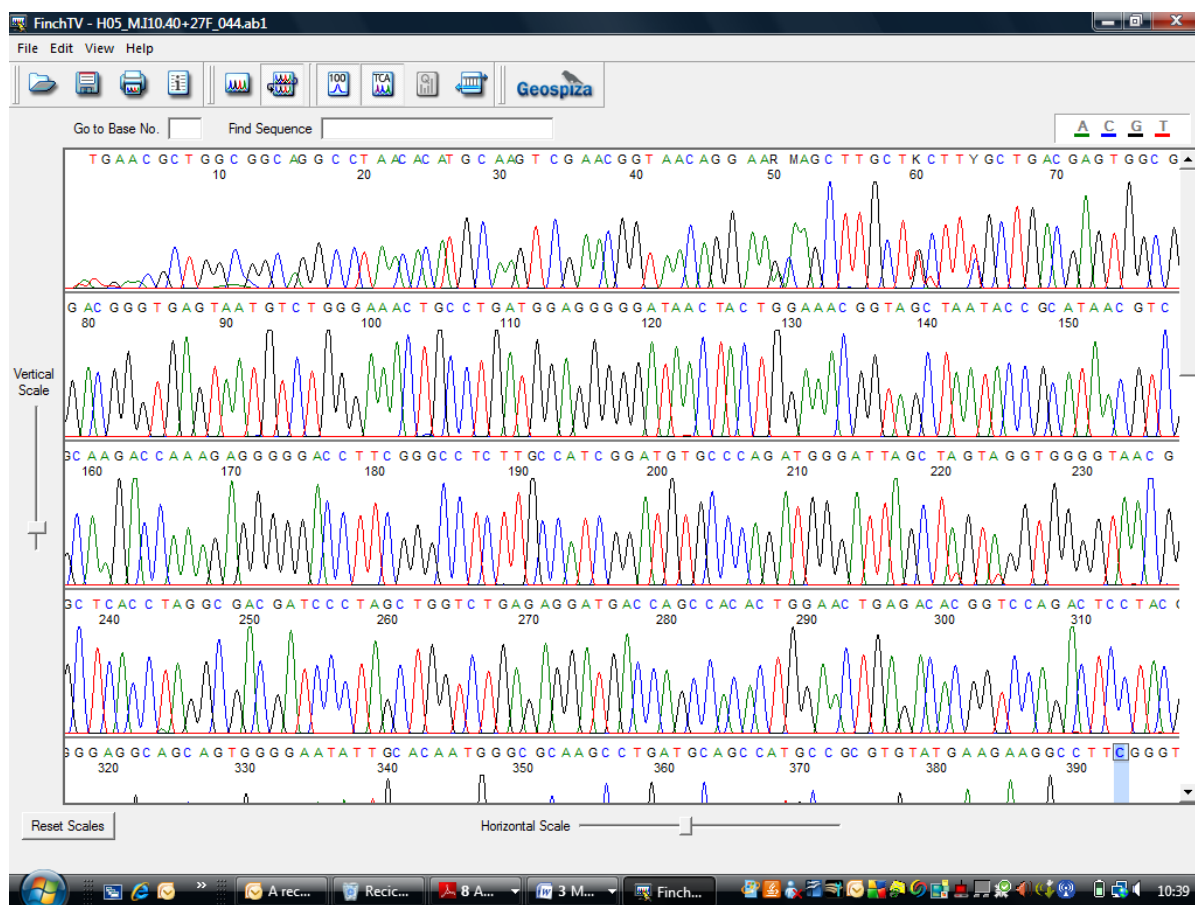


Figura 26: Sequência do gene 16S rDNA da bactéria *Proteus* spp.